



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECETOR HER-2 EM CARCINOMAS  
MAMÁRIOS CANINOS

ANDRÉ GARCIA BESELGA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutor António José de Freitas Duarte

VOGAIS

Doutor Mário António Pereira da Silva Soares de Pinho

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

CO-ORIENTADOR

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

2013

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECETOR HER-2 EM CARCINOMAS  
MAMÁRIOS CANINOS

ANDRÉ GARCIA BESELGA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Doutor António José de Freitas Duarte

VOGAIS

Doutor Mário António Pereira da Silva Soares de Pinho

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

ORIENTADOR

Doutor Fernando António da Costa Ferreira

CO-ORIENTADOR

Doutor Jorge Manuel de Jesus Correia

2013

LISBOA

---

## Agradecimentos

Gostava de agradecer a todos os que tornaram esta Dissertação de Mestrado e percurso académico possíveis, apesar de saber que as poucas palavras que escrevo não refletem, na totalidade, o quão especiais foram e são para mim:

- Um agradecimento muito especial à minha família, em particular aos meus pais, mana, avós, Mimi e Pintas por todo o apoio, paciência e amor transmitidos durante estes anos.
- À Marta, que foi, sem dúvida, uma fonte inesgotável de carinho, motivação e apoio, com os quais me ajudou a ultrapassar bastantes obstáculos.
- A todos os meus amigos de turma, de estágio e a todas as pessoas maravilhosas que tive oportunidade de conhecer ao longo deste curso, que me abraçaram com um sorriso.
- Aos meus amigos de fora da faculdade e aos amigos da música, companheiros de muitas aventuras e alegria.
- Ao Doutor Fernando Ferreira, meu orientador, que me permitiu estagiar nesta área e cuja presença foi crucial para o sucesso desta aventura, levando-me sempre a bom porto com a sua paciência, motivação e alegria. Agradeço todo o conhecimento, visão e boa disposição que me transmitiu, e que me tornou uma pessoa mais determinada e capaz de vencer desafios.
- Ao Doutor Jorge Correia, meu coorientador, que sempre me auxiliou durante o estágio, por todo o conhecimento transmitido, paciência e boa disposição, sendo um exemplo de força e determinação perante esta vida agri-doce.
- À Dr.<sup>a</sup> Maria João Soares por toda a dedicação, conhecimento, paciência e alegria com que me acarinhou ao longo do estágio, permitindo-me adquirir todas as ferramentas necessárias para realizar esta etapa.
- A todos os funcionários da secção de Anatomia Patológica, em especial, às técnicas Sandra Carvalho e Maria do Rosário, à D. Maria Augusta e à D. Manuela, por toda a ajuda e imensa simpatia que me transmitiram ao longo do estágio.
- Aos médicos do Hospital Escolar da FMV que me auxiliaram e permitiram recolher dados e material para que pudesse proceder a este estudo.
- A todos os animais que contribuíram para a escolha deste curso e para a minha formação, desde a minha infância, às primeiras aulas de Anatomia, até ao estágio final, sem os quais este percurso não faria sentido.
- A todos os que, por lapso, me esqueci de referir. Estarão sempre dentro do meu coração.
- Por fim, a tudo no Universo que me inspirou, direta ou indiretamente, a ser quem sou.



## Resumo

### AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECETOR HER-2 EM CARCINOMAS MAMÁRIOS CANINOS

Os tumores mamários são a segunda neoplasia mais comum no Cão, sendo a mais frequente na cadela, representando assim uma afeção de enorme importância em Medicina Veterinária. Recentemente, devido aos avanços na área da Biologia Molecular e à introdução de novos tratamentos no combate a esta doença na Mulher, aumentou o interesse na investigação e no desenvolvimento de conhecimento sobre os diferentes subtipos moleculares, em especial, os tumores que sobreexpressam HER-2 (HER-2+), na cadela. Na Mulher, os tumores que sobreexpressam HER-2 representam 20% a 30% da totalidade dos tumores mamários malignos e estão associados a um crescimento agressivo e prognóstico reservado. Na cadela, a percentagem de tumores HER-2+ parece variar entre os 8,3% e os 40%, mas a influência da sobreexpressão deste recetor no prognóstico ainda não está totalmente esclarecida devido à falta de uniformização da técnica de imunohistoquímica (IHQ) em tecidos caninos. Assim, este estudo teve como objetivo, a otimização da deteção de HER-2 nesta espécie, o esclarecimento do cenário epidemiológico dos tumores mamários caninos (TMC) HER-2+ e, com isto, a descrição de um putativo modelo biológico para o estudo de tumores mamários HER-2+ da Mulher. Utilizando a técnica de imunohistoquímica, foram testados quatro anticorpos (CB11, 4B5, TAB250 e SP3) e diferentes protocolos de recuperação antigénica. Apenas os anticorpos que reconhecem o domínio intracelular detetaram o recetor HER-2 da cadela. Foi identificada na amostra em estudo, uma sobreexpressão de HER-2 entre 19% e 40,5% dos TMC, dependendo do anticorpo. Não houve relação entre a sobreexpressão do recetor HER-2, o grau de malignidade, o tipo histológico do tumor ou outros indicadores de mau prognóstico. Uma vez que foi identificada sobreexpressão de HER-2 e, implicitamente, reatividade cruzada dos anticorpos anti-HER-2 humano com o recetor homólogo do Cão, conclui-se que a cadela poderá vir a ser utilizada como modelo biológico em estudos de Oncologia Comparada. Este facto irá contribuir para que se aprofunde o conhecimento nesta doença e que se apliquem novas abordagens terapêuticas no tratamento dos tumores mamários caninos em Medicina Veterinária.

*Palavras-Chave:* Tumores Mamários; Imunohistoquímica; Sobreexpressão; HER-2; Oncologia Comparada.



## **Abstract**

### **EVALUATION OF HER -2 EXPRESSION IN CANINE MAMMARY CARCINOMA**

Mammary tumours are the second most common neoplasm in Dog and the commonest tumour in the female dog, thus representing a disease with major importance in Veterinary Medicine. Recently, due to new insights in the Molecular Biology field and the introduction of new treatment options for cancer in Woman, the interest in the investigation and development of the knowledge about the molecular subtypes, especially HER-2 overexpressing tumours in the female dog, increased. Regarding woman, the HER-2 overexpressing tumours represent 20% to 30% of all breast cancer and are correlated with aggressive behaviour and poor prognosis. As for female dogs, the percentage of HER-2+ tumours seems to range between 8.3% and 40%, but the influence of this receptor's overexpression on prognosis is still unclear due to the lack of immunohistochemistry technic standardization in canine tissues. Thus, this study's purpose was to optimize HER-2 detection in this species, to find new insights about the HER-2+ canine mammary tumours epidemiological scenario, and in the process, to describe a putative biological model for HER-2+ mammary tumours investigation in Woman. We tested four antibodies (CB11, 4B5, TAB250 and SP3) and different antigenic retrievals protocols using the immunohistochemistry technic. HER-2 receptor was only measured with antibodies that target the intracellular domain (4B5 and CB11). HER-2 overexpression in the study sample was 19% and 40.5% of the canine mammary tumours. HER-2 overexpression was not correlated with the histological grade, tumour type and other established indicators of poor prognosis. Due to the identified HER-2 overexpression and cross-reactivity of the human anti-HER-2 antibodies with the homologous receptor in Dog, we conclude that the female dog might be used as a biological model for Comparative Oncology investigation. This will contribute to a better understating of this disease as well as to new therapeutic strategies in the treatment of the mammary gland tumours in Veterinary Medicine.

*Keywords:* Mammary Tumours; Immunohistochemistry; Overexpression; HER-2; Comparative Oncology.





# Índice Geral

Agradecimentos.....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	v
Índice Geral .....	vii
Índice de Figuras .....	ix
Índice de Gráficos.....	ix
Índice de Tabelas .....	x
Lista de Abreviaturas e de Símbolos.....	xii
I. Revisão Bibliográfica .....	1
1. Estrutura Anatômica e Histológica da Glândula Mamária .....	1
2. Tumores Mamários Caninos.....	4
2.1. Características.....	4
2.1.1. Epidemiologia.....	4
2.1.2. Localização preferencial e Metastização .....	5
2.1.3. Dimensões e Velocidade de Crescimento .....	6
2.1.4. Recetores hormonais .....	6
2.2. Fatores de Risco.....	7
2.2.1. Idade .....	7
2.2.2. Raça.....	7
2.2.3. Exposição Hormonal .....	7
2.2.4. Outros Fatores Analisados .....	8
2.3. Diagnóstico.....	9
2.3.1. Diagnóstico Clínico.....	9
2.3.2. Diagnóstico Citológico.....	10
2.3.3. Diagnóstico Histopatológico .....	11
2.4. Tratamento .....	17
2.4.1. Tratamento cirúrgico.....	17
2.4.2. Tratamento adjuvante.....	19
2.4.2.1 Quimioterapia .....	19
2.4.2.2 Radioterapia .....	19
2.4.2.3 Terapia hormonal.....	19
2.4.2.4 Imunoterapia.....	20
2.4.2.5 Outros Tratamentos Adjuvantes.....	21
2.5. Prognóstico.....	21
2.5.1. Idade .....	21
2.5.2. Dimensão do tumor .....	22
2.5.3. Fase clínica do tumor .....	22
2.5.4. Metastização nos linfonodos .....	22
2.5.5. Tipo histológico e grau de malignidade .....	23
2.5.6. Expressão de recetores hormonais .....	23
2.6. Classificação Molecular dos Tumores Mamários .....	24
2.6.1. Classificação Molecular na Mulher .....	24
2.6.2. Classificação Molecular na Cadela.....	27
3. Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico Tipo II .....	29
3.1. Estrutura Molecular.....	29
3.2. Mecanismo de Ação .....	30
3.3. Papel no Desenvolvimento Celular .....	31

3.4. HER-2 e os Tumores Mamários.....	32
3.4.1. Fármacos Anti-HER-2 .....	35
3.5. Avaliação do HER-2 nos Tumores Mamários Caninos.....	38
II. Objetivos do Trabalho Experimental .....	39
III. Material e Métodos .....	41
1. Amostragem.....	41
1.1. Recolha e Processamento .....	41
1.2. Seleção das Amostras .....	41
2. Imunohistoquímica (IHQ).....	43
2.1. Seleção de Fragmentos para Análise .....	43
2.2. Protocolo de Imunohistoquímica .....	43
2.3. Avaliação da Imunohistoquímica.....	45
2.4. Análise estatística .....	45
IV. Resultados .....	46
1. Caracterização da Amostra Populacional.....	46
1.1. Distribuição etária e rácica das cadelas portadoras de tumores mamários.....	46
1.2. Caracterização e distribuição dos tumores mamários.....	46
1.3. Frequência e distribuição dos tumores mamários benignos e malignos .....	49
1.4. Comparação dos métodos cirúrgicos.....	51
2. Perfil Imunohistoquímico dos Tumores Mamários Caninos .....	51
2.1. Imunoreatividade do anticorpo CB11 .....	51
2.2. Imunoreatividade do anticorpo 4B5.....	54
2.3. Imunoreatividade do anticorpo SP3 .....	55
2.4. Imunoreatividade do anticorpo TAB250 .....	55
2.5. Relação entre os Tumores HER-2+ e os Parâmetros Clínicos e Histopatológicos ..	56
2.5.1. Idade .....	56
2.5.2. Localização do tumor .....	56
2.5.3. Tipo Histopatológico e Grau de Malignidade .....	57
2.5.4. Diferenciação Mesenquimatosa Benigna.....	57
V. Discussão.....	58
VI. Conclusão .....	62
Bibliografia.....	63
Anexo I .....	73
Resumo das Atividades de Estágio .....	73
Anexo II .....	74
Resultados Imunohistoquímica.....	74
Anexo III .....	75
Estatística.....	75
Anexo IV .....	85
Trabalhos apresentados em congressos:.....	85
a. <i>Poster</i> apresentado no Congresso Anual da ESVONC 2013 (30-31 de maio & 1 de junho, Lisboa, Portugal) .....	85
b. Comunicação oral no XVIII Encontro da Sociedade Portuguesa de Patologia Animal (9 e 10 de maio de 2013, Évora, Portugal).....	87
c. <i>Poster</i> no XVIII Encontro da Sociedade Portuguesa de Patologia Animal (9 e 10 de maio de 2013, Évora, Portugal).....	89
d. <i>Poster</i> no Congresso Anual da ESVONC 2013 (30-31 de maio & 1 de junho de 2013, Lisboa, Portugal).....	91

## Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura histológica da glândula mamária .....	2
Figura 2. Rede linfática das glândulas mamárias na espécie canina .....	3
Figura 3: Estrutura molecular da proteína HER-2 .....	29
Figura 4. Recetores da família HER e seus ligandos .....	31
Figura 5. Resultado da técnica de FISH em tumor mamário de Mulher .....	34
Figura 6. Resultado da técnica de CISH em tumor mamário de Mulher .....	34
Figura 7. Resultado da técnica de SISH em tumor mamário de Mulher .....	35
Figura 8. Material resultante da Mastectomia Bilateral de uma das cadelas incluídas no estudo.....	48
Figura 9. Localização dos nódulos mamários numa das cadelas incluídas no estudo. ....	49
Figura 10. Variedade do aspeto macroscópico dos tumores mamários presentes na mesma cadela e linfonodos retromamários. ....	50
Figura 11. Avaliação do status de HER-2 num tumor mamário canino através da técnica de IHQ, utilizando o anticorpo CB11 e como método de recuperação antigénica a Panela de Pressão. ....	52
Figura 12. Avaliação do status de HER-2 num tumor mamário canino através da técnica de IHQ, utilizando o anticorpo CB11 e como método de recuperação antigénica a Panela de Pressão. ....	53
Figura 13. Avaliação do status de HER-2 num tumor mamário canino através da técnica de IHQ, utilizando o anticorpo CB11 e como método de recuperação antigénica a Panela de Pressão. ....	53
Figura 14. Avaliação do status de HER-2 num tumor mamário canino através da técnica de IHQ, utilizando o anticorpo CB11 e como método de recuperação antigénica a Panela de Pressão. ....	53
Figura 15. Comparação das intensidades de marcação obtidas após a utilização dos anticorpos SP3 e CB11, após tratamento com Panela de Pressão.....	55

## Índice de Gráficos

Gráfico 1. Distribuição etária das cadelas com tumores mamários. ....	46
Gráfico 2. Frequência absoluta do número de tumores excisados tendo em conta a raça. ...	47
Gráfico 3. Distribuição dos tumores mamários pelas glândulas mamárias.....	48
Gráfico 4. Frequência relativa dos tumores benignos e dos malignos.....	49
Gráfico 5. Distribuição dos tumores benignos e malignos em relação à idade das cadelas. ....	50
Gráfico 6. Frequência relativa dos diferentes procedimentos cirúrgicos.....	51
Gráfico 7. Classificação do status HER-2 após IHQ dos tumores mamários utilizando o anticorpo CB11 .....	52
Gráfico 8. Classificação do status HER-2 após IHQ dos tumores mamários utilizando o anticorpo 4B5.....	54
Gráfico 9. Classificação do status HER-2 após IHQ dos tumores mamários utilizando o anticorpo SP3.....	55

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Cálculo da fase evolutiva dos tumores mamários caninos .....	10
Tabela 2. Critérios utilizados na determinação do grau de malignidade dos tumores mamários caninos.....	16
Tabela 3. Grau de malignidade dos tumores mamários caninos .....	17
Tabela 4. Tipo histológico, frequência absoluta e grau de malignidade dos 53 tumores da região mamária da população alvo de estudo. ....	42
Tabela 5. Caracterização dos vários anticorpos primários utilizados.....	44
Tabela 6. Resumo dos critérios de interpretação da IHQ. ....	45
Tabela 7. Número de tumores identificados por cadela e número de cadelas afetadas por esse número. ....	47
Tabela 8. Média, Desvio Padrão e diâmetro máximo registado nos tumores benignos e nos tumores malignos.....	47
Tabela 9. Distribuição dos tumores HER-2-positivos utilizando o anticorpo CB11 relativamente aos diferentes métodos de recuperação antigénica .....	52
Tabela 10. Distribuição dos tumores HER-2-positivos utilizando o anticorpo 4B5 relativamente aos diferentes métodos de recuperação antigénica. ....	54
Tabela 11. Caracterização etária das cadelas com TMC HER-2+.....	56
Tabela 12. Caracterização histopatológica dos tumores analisados pela técnica de IHQ. ...	57
Tabela 13. Resultados da classificação da imunoreatividade de HER-2 em todos os protocolos realizados. ....	74
Tabela 14. Relação entre a sobreexpressão de HER2 e o método de recuperação antigénica utilizada para o anticorpo CB11. ....	75
Tabela 15. Relação entre a sobreexpressão de HER2 e o método de recuperação antigénica utilizada para o anticorpo 4B5.....	75
Tabela 16. Relação entre a sobreexpressão de HER2 e o método de recuperação antigénica utilizada para o anticorpo SP3. ....	75
Tabela 17. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Micro-ondas) e a idade das cadelas. ....	76
Tabela 18. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Panela de Pressão) e a idade das cadelas.....	76
Tabela 19. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+ Banho-Maria) e a idade das cadelas. ....	76
Tabela 20. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5 + Micro-ondas) e a idade das cadelas. ....	76
Tabela 21. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5 + Panela de Pressão) e a idade das cadelas.....	77
Tabela 22. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (SP3 + Micro-ondas) e a idade das cadelas. ....	77
Tabela 23. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+ Micro-ondas) e a localização do tumor. ....	77
Tabela 24. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+ Panela de Pressão) e a localização do tumor .....	78
Tabela 25. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+ Banho-Maria) e a localização do tumor .....	78
Tabela 26. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+ Micro-ondas) e a localização do tumor .....	79

Tabela 27. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+ Panela de Pressão) e a localização do tumor.....	79
Tabela 28. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (SP3+ Micro-ondas) e a localização do tumor .....	80
Tabela 29. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Micro-ondas) e o grau de malignidade do tumor. ....	80
Tabela 30. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Panela de Pressão) e o grau de malignidade do tumor. ....	80
Tabela 31. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Banho-Maria) e o grau de malignidade do tumor. ....	81
Tabela 32. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+Micro-ondas) e o grau de malignidade do tumor. ....	81
Tabela 33. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+Panela de Pressão) e o grau de malignidade do tumor. ....	81
Tabela 34. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (SP3+Micro-ondas) e o grau de malignidade do tumor. ....	82
Tabela 35. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Micro-ondas) e o tipo histológico.....	82
Tabela 36. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Panela de Pressão) e o tipo histológico.....	82
Tabela 37. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Banho-Maria) e tipo o histológico.....	82
Tabela 38. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+Micro-ondas) e o tipo histológico. ....	83
Tabela 39. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+Panela de Pressão) e o tipo histológico.....	83
Tabela 40. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Micro-ondas) e diferenciação mesenquimatosa benigna.....	83
Tabela 41. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Panela de Pressão) e diferenciação mesenquimatosa benigna.....	83
Tabela 42. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Banho-Maria) e diferenciação mesenquimatosa benigna.....	84
Tabela 43. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+Micro-ondas) e diferenciação mesenquimatosa benigna.....	84
Tabela 44. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+Panela de Pressão) e diferenciação mesenquimatosa benigna.....	84
Tabela 45. Relação entre a sobreexpressão de HER2 (SP3+Micro-ondas) e diferenciação mesenquimatosa benigna.....	84

## Lista de Abreviaturas e de Símbolos

Ad6 - Adenovírus do serotipo 6  
ADCC – Citotoxicidade celular anticorpo-dependente  
ADN – Ácido desoxirribonucleico  
Akt – Proteína-quinase B  
ALT - Alanina transaminase  
ARN – Ácido ribonucleico  
ASCO – Sociedade Americana de Oncologia Clínica  
atm – Atmosferas  
BM – Banho-Maria  
BRCA – Cancro da mama (*breast cancer*)  
cm – Centímetro  
CISH – Hibridação Cromogénica *In Situ*  
CK – Citoqueratinas  
COX-2 – Ciclo-oxigenase-2  
DAB – 3,3'-diaminobenzidina  
DNA-EP – Eletroporação/eletropermeabilidade-ADN  
EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacetico  
EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico  
FISH – Hibridação Fluorescente *In Situ*  
gl – Grau de liberdade  
HB-EGF – Fator de crescimento epidérmico que se liga à heparina  
HE – Hematoxilina-eosina  
HER - Recetor do fator de crescimento epidérmico  
HER-2+ – HER-2-positivo  
IHQ – Imunohistoquímica  
ki67 – Proteína ki67  
MAPK – Proteína quinase mitógeno activada  
Mw – Micro-ondas  
N.A. – Não aplicável.  
N.K. – Exterminadoras naturais (*Natural Killer*)  
PAAF – Punção aspirativa por agulha fina  
PARP1 – Poli-ADP ribosepolimerase-1  
PI3K - Fosfoinosítideo 3-quinase  
PBK – Proteína-quinase B  
PCK – Proteína-quinase C  
PLC –Fosfolipase C  
PP – Painel de Pressão  
qRT-PCR – PCR (reação em cadeia da polimerase) quantitativo em tempo real  
Ras – Família de proteínas constituída por GTPases  
Raf – Gene “*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*”  
RE – Recetores de estrogénios  
RP – Recetores de progesterona  
SISH – Hibridação com “Enriquecimento pela Prata” *In Situ*  
SKBR3 - Linha celular de adenocarcinoma mamário humano  
TGF- $\alpha$  – Fator de crescimento transformante alfa.  
TMC – Tumores mamários caninos  
Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular

W - Watts

% – Percentagem

+ – Mais

> – Maior

< – Menor

≥ – Maior ou igual

® – Marca registada

$\chi^2$  – Qui quadrado





# **I. Revisão Bibliográfica**

## **1. Estrutura Anatômica e Histológica da Glândula Mamária**

O desenvolvimento da glândula mamária tem início durante a vida embrionária, através da formação de espessamentos lineares paralelos da ectoderme, na parede ventral da barriga (McGeady, Quinn, FitzPatrick & Ryan, 2006). Estes espessamentos são interrompidos, formando botões mamários, em número apropriado, a partir dos quais se formam as glândulas mamárias funcionais. Da proliferação de células epiteliais do cordão mamário desenvolve-se o parênquima mamário com formação de estruturas circulares ocas, os alvéolos (Cunningham & Bradley, 2007) e um sistema tubular ramificado rudimentar (Peleteiro, 1994). Ao mesmo tempo forma-se uma zona exterior epitelial, o mamilo. Nos machos, apesar de frequentemente se desenvolverem mamilos, o cordão mamário primário não dá origem a tecido glandular substancial (Cunningham et al., 2007).

Após o nascimento, cada cadeia mamária é constituída por conjuntos de unidades glandulares compostos por um corpo glandular e um mamilo (König, 2002). Na cadela existem, geralmente, cinco pares de glândulas que formam duas cadeias mamárias paralelas, cuja simetria nem sempre é regular, estendendo-se da região torácica à região inguinal, sendo separadas por um sulco intermamário (Barone, 1976). Em relação à localização, os cinco pares são: dois pares torácicos (cranial e caudal), dois pares abdominais (cranial e caudal) e um par inguinal (Barone, 1976; König, 2002). Existem, no entanto, variações individuais que podem levar à existência de glândulas em número inferior ao normal, situação rara e que tende a afetar principalmente o primeiro par abdominal (Barone, 1976), ou a existência de glândulas supranumerárias, mais frequentemente nas regiões torácica e abdominal (Getty, 1981).

Em termos histológicos, a glândula mamária é uma glândula túbulo-alveolar composta (Banks, 1993; König, 2002; Junqueira & Carneiro, 2008). Esta apresenta 5 a 25 lóbulos, separados por septos de tecido conjuntivo denso e de tecido adiposo. A partir de cada lóbulo forma-se um ducto excretor denominado interlobular, que drena para um canal excretor de maior calibre, o ducto galactóforo (Junqueira & Carneiro, 2008) também referido como lactífero (Peleteiro, 1994) ou lobar (Banks, 1993). A jusante, estes sofrem uma dilatação ampolar designada seio lactífero e abrem-se direta e independentemente no mamilo, em número variável (Peleteiro, 1994; Junqueira & Carneiro, 2008). Na cadela, cada mamilo é composto por 7 a 16 aberturas ductais ou óstios externos (McGeady et al., 2006; Sorenmo, Rasotto, Zappulli & Goldschmidt, 2011). Outros autores referem 12 a 16 aberturas (Barone, 1976; König, 2002) ou 8 a 20 (Banks, 1993). O epitélio de revestimento dos ductos

interlobulares é, na sua porção inicial, um epitélio simples cilíndrico ou cúbico simples, envolvido por células mioepiteliais, na porção terminal. Os ductos galactóforos são compostos por uma camada dupla de células epiteliais cúbicas ou cilíndricas baixas. Este epitélio transforma-se em epitélio estratificado pavimentoso nas aberturas externas dos ductos galactóforos (Banks, 1993, Junqueira & Carneiro, 2008).

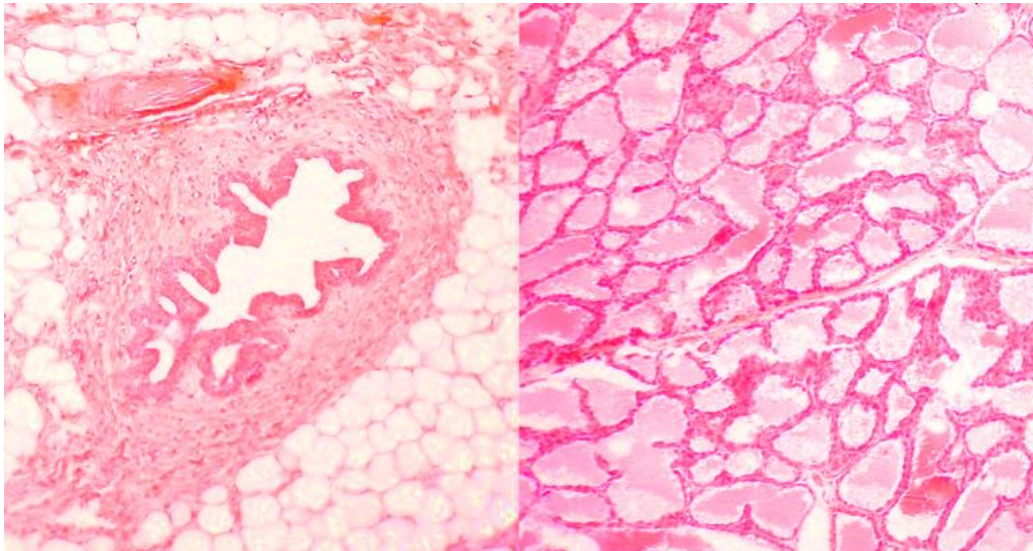


Figura 1. Estrutura histológica da glândula mamária (adaptado de Histology-World, 2013). Nesta imagem pode-se ver a estrutura histológica da glândula mamária inativa à esquerda e ativa à direita. (H&E, 100x).

Embora seja referida muitas vezes como uma glândula apócrina, este facto só se refere à secreção de lípidos, já que esta possui também função merócrina, quando realiza a secreção de proteínas e hidratos de carbono. Em relação à origem evolutiva da glândula mamária, embora haja controvérsia, vários estudos sugerem que esta evoluiu a partir das glândulas sudoríparas (König, 2002; McGeaddy et al., 2006).

Em relação à rede linfática das glândulas mamárias, há contato entre algumas glândulas homolaterais mas não parece existir comunicação entre as cadeias esquerda e direita (Peleteiro, 1994). As glândulas mamárias torácicas drenam para os linfonodos axilares acessórios e, muito ocasionalmente, também para os linfonodos esternais. As glândulas mamárias abdominais craniais drenam simultaneamente para os linfonodos axilares acessórios e para os linfonodos inguinais superficiais. Isto pode acontecer através da drenagem direta para o linfonodo ou através da ligação entre as glândulas abdominais craniais e caudais. Por seu lado, as glândulas abdominais caudais e glândulas inguinais drenam nos linfonodos inguinais superficiais (Peleteiro, 1994; König, 2002). Estas variações no fluxo linfático estão esquematizadas na figura 2 e são clinicamente importantes para a identificação de metástase tumorais (König, 2002).

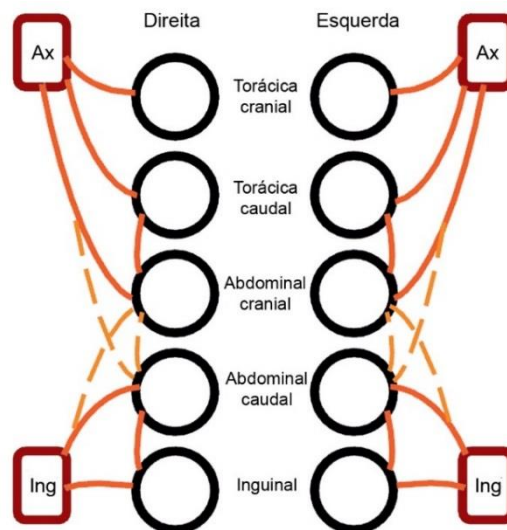


Figura 2. Rede linfática das glândulas mamárias na espécie canina (adaptado de Moore & Frimberger, 2010). Ax – Linfonodo axilar acessório; Ing – Linfonodos inguinais superficiais.

O desenvolvimento da glândula mamária continua-se na puberdade. A atividade ovárica cíclica, com a produção de estrogénios e de progesterona possibilita esse desenvolvimento. Os estrogénios, a par da hormona de crescimento e das hormonas esteroides adrenais, são responsáveis pela proliferação do sistema de ductos e o desenvolvimento dos alvéolos fica a cargo da ação da progesterona e da prolactina (Cunningham et al., 2007). A partir deste momento, o tamanho do corpo da glândula e dos mamilos, assim como a sua organização estrutural, passa a variar com a condição funcional da glândula mamária, isto é, se a fêmea é impúbere, púbere, gestante ou se está em lactação (Banks, 1993; Junqueira & Carneiro, 2008), e com as diferentes fases do ciclo éstrico (Sorenmo et al., 2011). Aliado a este facto, sabe-se que a glândula mamária permanece relativamente subdesenvolvida até a ocorrência de gestação (Banks, 1993; Cunningham et al., 2007). Já durante este período, a glândula mamária sofre modificações estruturais e evolui de uma estrutura composta essencialmente por estroma (tecido conjuntivo) para uma estrutura maioritariamente formada por células ducto-alveolares. A síntese de leite começa, geralmente, na fase final da gestação, devido ao aumento da prolactina produzida pela adenohipófise (Cunningham et al., 2007). Existem outras hormonas envolvidas na lactogénese como os glucocorticóides da supra-renal, a somatomotropina placentária e indiretamente, os estrogénios, a progesterona e a somatotropina (Peleteiro, 1994; Junqueira & Carneiro, 2008). Após o nascimento da prole, é sintetizado inicialmente o colostro, que vai conferir imunidade passiva nos primeiros tempos de vida aos recém-nascidos (Junqueira & Carneiro, 2008). Após a lactação, a maioria dos alvéolos desenvolvidos atrofia, e as células alveolares libertadas para o lúmen dos alvéolos são fagocitadas por macrófagos (Junqueira & Carneiro, 2008).

## 2. Tumores Mamários Caninos

Apesar dos grandes avanços científicos das últimas décadas, existe ainda um longo caminho a percorrer relativamente à compreensão dos mecanismos de carcinogénese dos tumores mamários. Influenciados por diversos fatores, estes processos, compostos pelas fases de iniciação, promoção e progressão tumoral, são desencadeados por alterações genéticas numa única célula (King & Robins, 2006). Posteriormente, as fases de promoção e de progressão tumoral resultam da acumulação de alterações genéticas, combinadas com a expansão e seleção clonal (Beckmann, Niederacher, Schnürch, Gusterson, & Bender, 1997; King & Robins, 2006). Foram encontradas alterações genéticas nos tumores mamários caninos, relacionadas com a carcinogénese, como a aneuploidia do ADN nuclear, detetada em 50-60% dos tumores mamários malignos; sobreexpressão do proto-oncogene HER-2; mutações no gene oncosupressor p53 (Misdorp, 2002); e mutações no gene BRCA1 (Sorenmo, Worley & Goldschmidt, 2013). Por outro lado, a progressão histológica dos tumores mamários reflete a ideia de que os tumores benignos e malignos não são entidades independentes. Em vez disso, fazem parte de um *continuum* biológico e histológico, no qual os carcinomas malignos altamente invasivos e metastáticos podem ser a fase final do processo (Sorenmo et al. 2009). Estas alterações no comportamento celular podem ser influenciadas por fatores externos, como a exposição hormonal, idade, raça, nutrição, etc (Misdorp, 2002; Sorenmo et al., 2013).

### 2.1. Características

#### 2.1.1. Epidemiologia

Os tumores mamários são a segunda neoplasia mais frequente na espécie canina, só sendo ultrapassados pelos tumores de pele (Moulton, 1990; Peleteiro, 1994; Morris & Dobson, 2001). Contudo, se nos focarmos apenas na cadela, os tumores mamários são a neoplasia mais frequente (Dorn, Taylor, Schneider, Hibbard & Klauber, 1968; Dobson, Samuel, Milstein, Rogers & Wood, 2002; Egenvall et al., 2005; Merlo et al. 2008). Num estudo de Dorn et al. (1968), realizado na Califórnia, a taxa de incidência anual foi identificada como sendo de 257,7 tumores mamários malignos por 100,000 cadelas inteiras e Misdorp (2002) refere uma taxa de 198/100.000, concluindo também que esta é três vezes maior que na espécie humana. Em estudos europeus, nomeadamente na Noruega e Itália, foi calculado que os tumores mamários malignos representam 50 a 70% dos casos de neoplasia nesta espécie (Moe, 2001; Merlo et al., 2008). No Reino Unido, a taxa de incidência anual de tumores mamários, benignos e malignos, foi determinada como sendo 205/100.000 (Dobson et al., 2002). Já um estudo, efetuado numa colónia de Beagles, refere que 71% das cadelas desenvolveu, pelo menos, um tumor mamário durante a sua vida (Benjamin, Lee &

Saunders,1999). A incidência exata dos tumores mamários e o seu rácio benigno/maligno pode ser difícil de determinar devido, principalmente, ao facto dos tumores benignos de pequeno diâmetro não serem muitas vezes motivo de consulta, não serem excisados cirurgicamente (Misdorp, 2002) ou não se proceder ao envio dos mesmos para análise histopatológica (Peleteiro, 1994).

Os tumores mamários surgem com mais frequência nas fêmeas inteiras (Dorn et al., 1968; Misdorp, 2002). Nos machos é uma neoplasia rara, com uma taxa de ocorrência de 0 a 2,7%, sendo geralmente inferior a 1% (Dorn, 1968; Bears, Schulman & Carter, 2012), podendo estar associada a alterações hormonais, como o sertolinoma (Misdorp, 2002). Por outro lado, Bears et al. (2012) não encontraram uma forte associação estatística entre o desenvolvimento de tumor mamário e a presença de doença testicular. Também, neste estudo, todos os tumores foram descritos como sendo benignos, algo que contradiz outros autores, como Jabara (1969), que descreve como sendo, mais frequente, o aparecimento de tumores mamários malignos nos machos e Misdorp (2002) que descreve que estes representam entre um terço a metade dos tumores mamários removidos cirurgicamente.

### **2.1.2. Localização preferencial e Metastização**

Os tumores mamários surgem com maior frequência nas glândulas mamárias abdominais e inguinais. Alguns autores atribuem isto ao facto de estas conterem maior quantidade de parênquima mamário (Brodey, Goldschmidt & Roszel, 1983; Ežerskyte, Zamokas, Grigonis, Juodžiukynienė, 2011; Sorenmo et al., 2013). Geralmente, os tumores mamários manifestam-se pela presença de um ou vários nódulos (Misdorp, 2002) e frequentemente há mais de uma glândula mamária afetada, podendo mesmo estar toda a cadeia homolateral envolvida (Peleteiro, 1994). Sorenmo et al. (2009) referem que 70% das cadelas inteiras apresentava mais de um tumor aquando do diagnóstico. Estes factos permitem considerar os tumores mamários neoplasias multicêntricas, com origem, muitas vezes, em múltiplas neoplasias primárias ou, noutros casos, como resultado da extensão do processo primário, pela rede linfática, a outras glândulas mamárias (Peleteiro, 1994).

Para além de poder afetar outras glândulas mamárias a metastização dos carcinomas mamários atinge também outros órgãos, sendo os linfonodos regionais e os pulmões, os que apresentam uma frequência mais elevada. A metastização pode também ocorrer noutros órgãos, nomeadamente rim, fígado, baço, pele, encéfalo e esqueleto (Peleteiro, 1994; Sorenmo et al. 2013). Por outro lado, os tumores mamários sarcomatosos metastizam por via sanguínea, o que implica metastização à distância em vários órgãos, sem que os

linfonodos regionais surjam afetados (Peleteiro, 1994). Aproximadamente 30% dos carcinomas e cerca de 75% dos sarcomas originam metástases (Sorenmo, 2003).

### **2.1.3. Dimensões e Velocidade de Crescimento**

Os tumores mamários identificam-se geralmente como nódulos de superfície bosselada e, regra geral, bem circunscritos (Peleteiro, 1994). O nódulo, ou nódulos, presente pode apresentar dimensões variáveis (Peleteiro, 1994; Sorenmo et al., 2011), não ultrapassando, geralmente, os 10cm de diâmetro (Peleteiro, 1994). A mobilidade é, também, variável, desde tumores bastante móveis, tornando a fixação à palpação difícil, a tumores com um extenso envolvimento do tecido cutâneo e, por vezes, muscular (Peleteiro, 1994; Sorenmo et al., 2011; Sorenmo et al., 2013). Existem tumores de crescimento lento e de crescimento rápido, ou muito rápido, com esta aceleração a poder estar relacionada com o período após o estro. Esta situação é mais frequente nos tumores quísticos e a influência da progesterona parece ser determinante para ocorra essa aceleração. A velocidade de crescimento pode ser um parâmetro importante a ter em conta na avaliação das neoplasias mamárias, por poder dar indicações acerca da possível malignidade (Peleteiro, 1994).

### **2.1.4. Recetores hormonais**

Os tumores, especialmente os de origem epitelial, expressam recetores de estrogénio (RE) e recetores de progesterona (RP) (Sorenmo et al., 2013). A quantidade de recetores é influenciada pela idade e estado hormonal da cadela (Donnay, 1995; Martín de las Mulas, Millan & Dios, 2005). Isto significa que cadelas inteiras, jovens ou em estro têm maior propensão para ter tumores que expressam RE e RP do que as esterilizadas, velhas ou em anestro. A expressão destes recetores hormonais é também influenciada pelo tamanho e diferenciação histológica dos tumores. Tumores maiores e mais indiferenciados, ou anaplásicos, têm menor tendência para expressar recetores comparativamente aos mais pequenos, benignos e melhor diferenciados. Esta perda de recetores hormonais pode indicar uma certa evolução na independência tumoral e também estar relacionado com uma maior agressividade clínica e histológica (Nieto et al., 2000; Martín de las Mulas et al., 2005; Chang et al., 2009).

## **2.2. Fatores de Risco**

### **2.2.1. Idade**

O risco de desenvolvimento da neoplasia mamária aumenta progressivamente com a idade (Sorenmo et al., 2013) e costuma ser raro em cadelas com idade inferior a 5 anos (Dorn, 1968; Schneider, 1970; Sorenmo et al., 2009). A incidência aumenta abruptamente entre os 6 e os 12 anos (Schneider, 1970; Egenvall et al., 2005; Carolyn, 2009), sendo que a idade de maior suscetibilidade se situa entre os 9 e os 11 anos (Peleteiro, 1994). De notar também que o pico de incidência varia consoante a esperança média de vida de cada raça (Sorenmo et al., 2013). Em relação à malignidade tumoral, os tumores benignos surgem, geralmente, com mais frequência aos 7-9 anos e os malignos aos 9-11 anos (Benjamin et al., 1999; Sorenmo et al., 2009).

### **2.2.2. Raça**

Em relação à predisposição racial, não existe um consenso alargado, principalmente devido às discrepâncias entre estudos (Sorenmo et al., 2013). Geralmente, os tumores mamários surgem com mais frequência em cães de raça pequena mas, por vezes, isto deve-se apenas ao grande número de casos destas raças nos estudos (Sorenmo et al., 2011). Num estudo, conduzido por Vascellari, Baioni, Ru, Carminato & Mutinelli (2009), foi descrito que os cães de raça pura têm tendência a apresentar duas vezes mais incidência de tumores malignos do que os cães sem raça definida. Alguns autores sugerem que as raças mais afetadas são: Poodle, Chihuahua, Daschund, Yorkshire Terrier e Cocker Spaniel, English Springer Spaniel, Setter Inglês, Pastor Alemão, Pointer, Doberman e Boxer (Dorn, 1968; Yamagami, Kobayashi, Takahashi & Sugiyama, 1996b; Moe, 2001; Egenvall et al., 2005). Em Portugal, na área da grande Lisboa, num estudo que englobou a presença de 320 cadelas com tumor mamário, constatou-se que as raças mais afetadas foram, por ordem decrescente de incidência: Caniche, Cocker e Yorkshire Terrier (Costa, 2011).

### **2.2.3. Exposição Hormonal**

A influência hormonal no desenvolvimento de neoplasias mamárias ocorre, principalmente, quando a cadela é jovem e decai com o aumento da frequência dos ciclos éstricos (Carolyn 2009, Sorenmo, 2013). De facto, a ovariectomia tem maior efeito protetor se for realizada antes do primeiro estro, com um risco de desenvolvimento de neoplasia mamária de apenas 0,5% (Schneider, Dorn & Taylor, 1969). De acordo com este estudo, o risco aumenta progressivamente nos primeiros ciclos, sendo de 8% antes do segundo e de 25% antes do terceiro ciclo éstrico. Após os quatro anos de idade, o efeito protetor da ovariectomia parece ser mínimo e não existe benefício em realizar esta cirurgia



(Sorenmo, 2013). Em relação à realização de ovariohisterectomia na altura da mastectomia, existem estudos com resultados discordantes; para Yamagami et al. (1996a) não existe qualquer benefício, nem alteração no prognóstico. Outro estudo revela que os efeitos benéficos da ovariohisterectomia são mínimos após os dois anos e meio de idade mas, o efeito é mais elevado se for realizada na altura da mastectomia (Sorenmo, Shofer & Goldschmidt, 2000). Num estudo posterior, verificou-se que as cadelas ovariohisterectomizadas apresentavam taxas de sobrevivência, dois anos após a mastectomia, superiores às não ovariohisterectomizadas, especialmente quando diagnosticadas com carcinomas complexos (Chang, Chang, Chang & Wong, 2005).

#### **2.2.4. Outros Fatores Analisados**

O peso corporal, quando em excesso, especialmente durante a puberdade, parece estar correlacionado com o aumento do risco de tumor mamário (Sonnenschein, Glickman, Goldschmidt & McKee, 1991). Neste estudo foi verificado que o risco era menor nas cadelas castradas que tivessem uma condição corporal magra aos 9-12 meses de idade. Por outro lado, o mesmo estudo, não conclui que o risco aumentasse no caso de a cadela ser obesa ou ser alimentada com uma dieta rica em gordura.

Num estudo sobre a influência dos contaminantes ambientais no desenvolvimento de neoplasias mamárias, foram identificados níveis elevados de inseticidas, nomeadamente piretróides, no tecido adiposo adjacente aos tumores. Esta contaminação era particularmente significativa nos tumores mais agressivos, sugerindo que os piretróides podem estar envolvidos na carcinogénese dos tumores mamários caninos (Andrade, Figueiroa, Bersano, Bissacot & Rocha 2010). Apesar de ser uma hipótese interessante, é preciso ter alguma precaução visto que o estudo foi realizado numa amostra muito pequena.

Misdorp (2002) refere que, apesar de haver estudos contraditórios, a desregulação dos níveis da hormona de crescimento, ou da prolactina, pode estar relacionada com um aumento do risco de desenvolvimento de tumor mamário.

## **2.3. Diagnóstico**

### **2.3.1. Diagnóstico Clínico**

O diagnóstico clínico deve ter como apoio uma história pregressa o mais completa possível, tentando não omitir informação importante como: o início e progressão da lesão, manifestação de prurido, secreção ou dados sobre o comportamento sexual do animal (Peleteiro, 1994). Deve-se ter especial atenção aos grupos de risco, nomeadamente às fêmeas inteiras de meia-idade (Sorenmo et al., 2013). No exame físico, a palpação permite detetar nódulos com diâmetro superior a 0,5 centímetros, pelo que esta deve ser extremamente cuidadosa, utilizando a ponta dos dedos, e ser sempre realizada em todas as glândulas mamárias, com especial atenção para as mais caudais (Peleteiro, 1994; Morris & Dobson, 2001). Os mamilos devem, também, ser inspecionados e cuidadosamente espremidos para se avaliar a presença de secreção ou dor. A palpação dos linfonodos regionais deve, também, fazer parte do exame físico, sendo que estes só se encontram palpáveis, regra geral, se se encontrarem hipertrofiados (Peleteiro, 1994). As glândulas mamárias devem ser palpadas novamente antes da mastectomia, sob o efeito anestésico, para garantir que ambas as cadeias são cuidadosamente avaliadas e que todos os tumores são detetados e incluídos no plano cirúrgico (Sorenmo et al., 2013). Para um correto diagnóstico, estadiamento da doença e escolha do tratamento pode, também, ser útil ter dados analíticos como o hemograma, análises bioquímicas, punção aspirativa de agulha fina (PAAF) dos linfonodos regionais (mesmo que normais à palpação), ecografia abdominal e exame radiográfico do tórax (Sorenmo, 2013). Mesmo que não haja suspeita de metastização, o exame radiográfico deverá ser realizado sistematicamente, contribuindo para um melhor conhecimento da fase evolutiva e da extensão do processo neoplásico. Contudo, as metástases pulmonares podem estar ocultas se forem menores que 0,5 cm, se estiverem cobertas pela sombra cardíaca ou pelos grandes vasos. Isto significa que um resultado radiográfico negativo não é sinónimo de inexistência de metastização (Peleteiro, 1994). A tomografia axial computadorizada (TAC) da cavidade torácica proporciona uma deteção mais sensível das possíveis metástases pulmonares mas, uma vez que é um procedimento que necessita de anestesia, caro e pouco disponível, pode tornar difícil a sua utilização sistemática (Otoni et al., 2010; Sorenmo et al., 2013).

A avaliação clínica vai proporcionar a classificação de cada tumor segundo o sistema TNM (Tumor, Linfonodo e Metástase) (Peleteiro, 1994; Sorenmo et al., 2013). Atualmente, a maioria dos oncologistas utiliza uma versão modificada do sistema originalmente proposto por Owen (1980), e que permite classificar a progressão da doença em 5 fases (Tabela 1) (Sorenmo et al., 2013). Este sistema só se aplica a tumores epiteliais (excluindo o carcinoma inflamatório) e, no caso de tumores múltiplos, deve ser atribuída uma

classificação a cada neoplasia (Peleteiro, 1994; Sorenmo et al., 2013). Este sistema proporciona ao clínico melhores condições para estabelecer um prognóstico, planejar o tratamento e dar informações precisas ao anatomopatologista sobre o material enviado para análise (Peleteiro, 1994).

Tabela 1. Cálculo da fase evolutiva dos tumores mamários caninos (adaptado de Sorenmo et al. 2013).

Fase	Tamanho do tumor (T)	Linfonodo (N)	Metástase (M)
Fase 1	T1 < 3 cm	N0	M0
Fase 2	T2 3-5 cm	N0	M0
Fase 3	T3 > 5 cm	N0	M0
Fase 4	Indiferente	N1 (positivo)	M0
Fase 5	Indiferente	Indiferente	M1 (metastização)

### 2.3.2. Diagnóstico Citológico

A citologia é realizada por punção aspirativa de agulha fina (PAAF), uma técnica não traumatizante, que não necessita de anestesia e que permite obter material de elevada qualidade (Peleteiro, 1994). Devido a, por vezes, a neoplasia mamária ser de grandes dimensões e apresentar diferente constituição celular, com grande heterogeneidade tecidual (Solano-Gallego, 2010), leva a que alguns autores não considerem a PAAF como a técnica de diagnóstico mais indicada (Peleteiro, 1994; Zuccari, Santana & Rocha 2001). De facto, a frequência com que se obtêm amostras inadequadas, com inúmeras células necrosadas, com sangue ou macrófagos revelando eritrofagia ou constituídas por quantidades consideráveis de líquido no caso dos tumores quísticos, dificulta a obtenção de um bom esfregaço (Peleteiro, 1994). Ainda assim, o exame citológico pode ajudar a descartar a presença de neoplasia não mamária, como o caso dos lipomas e dos mastocitomas (Sorenmo et al., 2013), e na diferenciação entre lesão neoplásica, mastite ou quisto mamário (Solano-Gallego, 2010). Contudo, é de salientar que foi determinada uma correlação entre os resultados do diagnóstico citológico e do histológico de 93% para os tumores mamários benignos e de 81% para os tumores mamários malignos (Simon et al., 2009). Segundo estes autores, o exame citológico apresenta também uma sensibilidade e especificidade satisfatória no diagnóstico de malignidade e do prognóstico. Para Cassali, Gobbi, Malm e Schmitt (2007), a correlação entre o exame citopatológico e histopatológico foi de 67,5%, ou de 92,9% quando os casos inconclusivos foram removidos da análise estatística.

### 2.3.3. Diagnóstico Histopatológico

O diagnóstico histopatológico é fundamental para a correta avaliação da lesão suspeita de ser neoplasia mamária (Peleteiro, 1994). Este exame é geralmente realizado em toda a lesão tumoral, uma vez que a cirurgia continua a ser o método de tratamento mais frequentemente utilizado. A realização de biópsia das massas suspeitas é, geralmente, posta de parte, exceto nos casos em que a cirurgia não é recomendada, nomeadamente, nas recidivas ou animais de idade avançada (Peleteiro, 1994).

Em 1974, a Organização Mundial de Saúde publicou a primeira “Classificação Histológica Internacional de Tumores dos Animais de Companhia” (Hampe & Misdorp, 1974). Nesta classificação estavam incluídos os tumores e as displasias da glândula mamária, baseada em três artigos escritos e publicados por Misdorp e os seus colaboradores anos antes. Esta classificação era baseada essencialmente na histopatologia (morfologia descritiva) e, numa fração menor, na origem morfológica e prognóstico, sendo aceite pela comunidade científica e tornando-se o pilar para a classificação dos tumores malignos caninos durante muitos anos (Goldschmidt, Pena, Rasotto, & Zappulli, 2011). Em 1999 foi apresentada uma nova classificação, que nada mais era que uma revisão da classificação original (Misdorp, Else, Hellmén, & Lipscomb, 1999). Recentemente, Goldschmidt et al. (2011) propuseram uma nova classificação para os tumores mamários caninos, baseando-se no facto de que, desde 1999, novos subtipos histológicos foram descritos e, assim sendo, era necessário uma nova classificação, organização e nomenclatura. Algumas diferenças entre esta nova classificação e as anteriores são: a especificação de novas entidades que anteriormente eram englobadas na mesma categoria, como por exemplo o carcinoma simples do tipo cribriforme e o comedocarcinoma que, anteriormente, eram classificados no grupo do carcinoma *in situ* (Misdorp et al., 1999); foram identificadas variações malignas de neoplasmas benignos anteriormente descritos, como o caso do carcinoma ductal, variante maligna do adenoma ductal, que era classificado como adenoma basalóide e o caso do carcinoma papilar intraductal, variante maligna do adenoma papilar intraductal, que era classificado como papiloma ductal (Misdorp, 1999); novas entidades foram incluídas, nomeadamente o carcinoma micropapilar e o carcinoma e mioepitelioma maligno. De seguida, apresenta-se uma breve descrição desta recente classificação:

#### a) Tumores Epiteliais Malignos:

- **Carcinoma *In Situ*:** consiste na presença de nódulos bem definidos, com grande riqueza celular, que não ultrapassam a membrana basal, rearranjados em túbulos irregulares. Há perda da arquitetura normal, da polaridade celular e nuclear, e aumento do número de figuras mitóticas.

- **Carcinoma Simples:** constituído por apenas um tipo de células malignas, que podem ser do tipo epitelial luminal ou mioepitelial. Está dividido nos seguintes subtipos:
  - **Tubular:** presença de células que se dispõem em túbulos com estroma intertubular composto por tecido conjuntivo. Este subtipo é dos mais comuns na cadela. As células neoplásicas podem infiltrar o tecido mamário envolvente.
  - **Túbulo-papilífero:** presença de túbulos neoplásicos dispostos em papilas pediculares ou sésseis que são suportadas por estroma de tecido conjuntivo fibrovascular.
  - **Papilífero-quístico:** difere do tubular porque contém lumens dilatados, formando quistos.
  - **Cribriforme:** tipo histológico pouco comum, onde os lumens são pequenos e geralmente arredondados, envolvidos em cordões de células neoplásicas.
- **Carcinoma Micropapilar Invasivo:** no tecido mamário existem um ou mais nódulos caracterizados por uma população intraductal de células neoplásicas que formam pequenos agregados intraluminais irregulares e pequenas papilas sem um pedúnculo fibrovascular de suporte, rodeados por espaços lacunares vazios.
- **Carcinoma Sólido:** conjuntos compactos de células neoplásicas dispostas em lâminas, cordões ou massas sólidas, sem presença de lúmen, formando lóbulos densos e de tamanho irregular. É menos frequente que o subtipo tubular.
- **Comedocarcinoma:** caracterizado pela presença de áreas de necrose no centro dos agregados de células neoplásicas. Nas áreas de necrose, existe muito material eosinofílico amorfo combinado com detritos celulares.
- **Carcinoma Anaplásico:** é o tumor mais maligno dentro dos carcinomas mamários, e frequentemente apresenta invasão neoplásica difusa no tecido conjuntivo interlobular e nos vasos linfáticos. As células neoplásicas estão frequentemente individualizadas ou agrupadas em pequenos conjuntos.
- **Carcinoma que surge num Tumor Misto/Adenoma Complexo:** a variante benigna deste tumor ainda é detetável na amostra mas existem áreas com mais células epiteliais pleomórficas que mostram um aumento marcado do número de mitoses (focos de células do carcinoma).
- **Carcinoma de Tipo Complexo:** a designação “complexo” significa que o tumor é composto por dois tipos celulares, células epiteliais e mioepiteliais. Neste caso, a componente epitelial é maligna e a mioepitelial é benigna. Só as células epiteliais exibem fenómenos de anisocariose e anisocitose acentuados.
- **Carcinoma e Mioepitelioma Maligno:** as componentes epitelial e mioepitelial são malignas.

- **Carcinoma do Tipo Misto:** carcinoma pouco comum que se caracteriza por possuir uma componente epitelial maligna e uma componente mesenquimatosa benigna, sendo esta composta por cartilagem e/ou osso e/ou tecido adiposo. Apresenta três ou mais populações de células suportadas por estroma fibrovascular.
- **Carcinoma Ductal:** as células estão dispostas em cordões e túbulos que circundam lumens estreitos frequentemente revestidos por uma camada dupla de células epiteliais. Exibe anisocariose, anisocitose e um aumento do número de figuras mitóticas.
- **Carcinoma Papilar Intraductal:** existe proliferação de células epiteliais malignas dispostas em várias camadas (estratificado).

b) Tumores Epiteliais Malignos – Tipos Especiais. Esta categoria engloba subtipos histológicos menos frequentes:

- **Carcinoma de Células Escamosas:** formado unicamente por epitélio escamoso que teve origem nas células escamosas do canal do mamilo ou da metaplasia escamosa das células epiteliais dos ductos.
- **Carcinoma de Tipo Adenoscamoso:** diferente do anterior por apresentar áreas de carcinoma (qualquer dos tipos anterior descritos) alternadas com áreas de epitélio escamoso.
- **Carcinoma de Tipo Mucinoso:** este carcinoma raro é caracterizado pela produção abundante de mucina. As células produtoras de muco podem ser individuais ou estar agregadas e formar túbulos e ninhos.
- **Carcinoma rico em lípidos:** consiste na presença de camadas de células com trabéculas fibrovasculares impercetíveis e focos de necrose. As células são arredondadas, com membranas celulares bem definidas e citoplasma moderado a abundante contendo numerosos vacúolos de dimensões pequenas ou apenas um vacúolo de maiores dimensões, geralmente perifericamente ao núcleo.
- **Carcinoma de Células Fusiformes:** a morfologia das células neoplásicas pode ser insuficiente para se obter um diagnóstico conclusivo, sendo necessário a imunohistoquímica (IHQ) para os diferenciar dos sarcomas mesenquimatosos de células fusiformes. Divide-se nos seguintes subtipos: Mioepitelioma maligno, carcinoma de células escamosas – variante de células fusiformes.
- **Carcinoma Inflamatório:** o termo “inflamatório” indica que este carcinoma é uma entidade clínica caracterizada por uma evolução fulminante, de apresentação súbita, com presença de edema, eritema, consistência firme e aumento da temperatura da glândula mamária, com ou sem presença de nódulos mamários. A característica histológica fundamental para se confirmar que se trata de um carcinoma mamário inflamatório é a invasão dos vasos linfáticos da derme por agregados de células neoplásicas.

c) Tumores Malignos de Origem Mesenquimatosa – Sarcomas: esta subcategoria inclui o **Osteossarcoma, Condrossarcoma, Fibrossarcoma, Hemangiossarcoma** e o **Carcinossarcoma (Tumor Mamário Misto Maligno)**. Destaca-se o Osteossarcoma por ser o tumor mesenquimatoso mais frequente. Este é geralmente, acompanhado de uma história de crescimento recente e rápido de uma massa mamária que poderia estar presente durante algum tempo (anos inclusive). A morfologia das células pode variar desde um aspeto fusiforme, estrelado ou ovoide, e há uma associação com ilhéus de tumor osteoide e/ou formação de tecido ósseo. A metastização ocorre por via sanguínea, principalmente para os pulmões. Outro subtipo frequente é o Carcinossarcoma composto, parcialmente, por células que se assemelham morfológicamente à componente epitelial e a elementos de tecido conjuntivo, sendo ambas malignas. A componente epitelial metastiza por via linfática, preferencialmente, para os linfonodos regionais e pulmão, e a componente mesenquimatosa metastiza por via sanguínea, preferencialmente para os pulmões.

d) Tumores Mamários Benignos:

- **Adenoma Simples:** formado por lesões nodulares bem demarcadas compostas por um único tipo celular, epitelial ou mioepitelial, com estroma fibrovascular escasso a moderado. A anisocariose e a anisocitose são mínimas com poucas figuras de mitose.
- **Adenoma Papilar Intraductal:** adenoma com a formação de papilas suportadas por pedúnculos de tecido fibrovascular. As papilas podem-se desenvolver em focos únicos ou múltiplos.
- **Adenoma Ductal:** neste caso a massa neoplásica está frequentemente presente no interior do lúmen (ou lumens) do ducto (ou ductos) ectásicos.
- **Fibroadenoma:** composto por túbulos revestidos com células colunares que possuem núcleos arredondados e uniformes. A envolver os túbulos existe uma extensa área de tecido conjuntivo fibroso e hialinização do estroma.
- **Mioepitelioma:** é uma neoplasia rara composta por pequenos feixes de células fusiformes combinados com uma matriz mixoide (Material fibrilar extracelular basofílico).
- **Adenoma Complexo (Adenomioepitelioma):** formado pela proliferação tanto do componente epitelial (tubular) como do mioepitelial e por quantidades variáveis de estroma fibroso.
- **Tumor benigno misto:** este subtipo tumoral apresenta proliferação epitelial benigna (tubular) com focos de tecido cartilágneo e/ou ósseo também benigno.

e) Hiperplasias/displasias: várias lesões hiperplásicas e displásicas são consideradas lesões precursoras do desenvolvimento de neoplasia mamária.

- **Ectasia Ductal:** consiste na dilatação dos ductos de maior calibre com acumulação de detritos necróticos, macrófagos combinados com material lipídico e lâminas de colesterol. Pode ser secundária à oclusão de um ducto devido à presença de um tumor intraductal.
- **Hiperplasia Lobular:**
  - **Regular (Adenose):** proliferação não neoplásica de ductos com consequente aumento do número de ductos e ácinos por lóbulo. As células epiteliais não possuem nenhuma alteração atípica e este tipo de tecido pode surgir adjacente aos tumores mamários benignos e malignos.
  - **Com atividade secretora (Láctea):** Subtipo de proliferação celular semelhante ao anterior mas com ácinos revestidos por células secretoras ativas e, por isso, com acumulação de secreção nos ácinos e ductos.
  - **Com fibrose (tecido conjuntivo interlobular fibroso):** subtipo de proliferação celular semelhante a Hiperplasia Lobular Regular mas com um aumento significativo da quantidade de tecido conjuntivo interlobular fibroso.
  - **Com Atipia:** subtipo de proliferação celular semelhante a Hiperplasia Lobular Regular mas com as células a apresentarem atipia que inclui: hiper cromasia nuclear, anisocariose, anisocitose e um número variável de figuras de mitose. Pode ser difícil diferenciar este subtipo tumoral do Carcinoma *In Situ*.
- **Epiteliase:** também denominada de Hiperplasia Intraductal sem Atipia, consiste na proliferação regular de células epiteliais no lúmen dos ductos, podendo mesmo preenchê-los por completo.
- **Papilomatose - Intraductal:** existe proliferação intraductal de papilas epiteliais, de forma focal ou multifocal, sem que haja estroma fibrovascular de suporte.
- **Alteração Fibroadenomatosa:** é uma lesão pouco comum e que consiste na proliferação de ductos interlobulares e de células do estroma periductal.
- **Ginecomastia:** esta alteração refere-se ao aumento das glândulas mamárias do macho devido a ectasia ductal e a hiperplasia lobular. Pode estar afetada mais de uma glândula. Esta alteração é frequentemente associada a tumores testiculares (Sertolinomas).

f) Neoplasias do mamilo:

- **Adenoma e Carcinoma Ductais:** são neoplasias raras que envolvem apenas e somente o tecido do mamilo que está aumentado e firme. Os ductos estão revestidos por uma ou mais camadas de células epiteliais. Estas células podem ter



pleomorfismo reduzido (adenomas) ou ter um aumento significativo de anisocariose e anisocitose e haver agregados no lúmen ductal (carcinomas).

- **Carcinoma Com Infiltração Epidérmica:** consiste na presença de um carcinoma na glândula mamária subjacente e infiltração de células ou agregados celulares neoplásicos na epiderme do mamilo.

g) Hiperplasias/displasias do mamilo:

- **Melanose da pele do mamilo:** alteração na proliferação de melanócitos da epiderme do mamilo. É uma lesão focal e que circunda as aberturas ductais do teto.

Os tumores mamários epiteliais são também classificados segundo outros critérios histopatológicos específicos (Sorensen et al., 2013). Existem vários sistemas de classificação baseados no Sistema de Elston e Ellis (1991), incorporando informações sobre: a diferenciação do tumor (constituição tubular), o pleomorfismo nuclear e o número de mitoses por campo (10x) (Misdorp, 2002; Clemente, Perez-Alenza, Illera & Peña, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2. Critérios utilizados na determinação do grau de malignidade dos tumores mamários caninos (adaptado de Clemente et al., 2010).

Diferenciação tumoral	Pleomorfismo nuclear	Mitoses por campo (10x)
Constituição tubular > 75% do espécime: <b>1 ponto</b>	Núcleo pequeno, regular e uniforme, com presença ocasional de nucléolo: <b>1 ponto</b>	0-9: <b>1 ponto</b>
Constituição tubular moderada (10%-75% do espécime) combinado com áreas de crescimento tumoral sólido: <b>2 pontos</b>	Variação moderada no tamanho e forma nuclear, núcleo hipercromático e nucléolo visível (que pode ser proeminente): <b>2 pontos</b>	10-19: <b>2 pontos</b>
Ausência ou constituição tubular mínima (<10%): <b>3 pontos</b>	Variação marcada no tamanho nuclear, núcleo hipercromático, frequentemente com um ou mais nucléolos: <b>3 pontos</b>	>20: <b>3 pontos</b>

Depois de obtido o somatório da classificação, o grau de malignidade do tumor pode ser determinado. Assim sendo, o grau 1 (pontuação baixa) corresponde a um tumor bem diferenciado, o grau 2 (pontuação intermédia) corresponde a um tumor moderadamente diferenciado e o grau 3 de malignidade (pontuação máxima) corresponde a um tumor pouco diferenciado (Tabela 3) (Misdorp, 2002). O grau de malignidade tem sido considerado uma fonte de informação confiável na determinação do prognóstico, como mais adiante veremos,

no capítulo sobre este assunto (Goldschmidt, et al., 2001; Misdorp, 2002; Karayannopoulou, Kaldrymidou, Constantinidis, & Dessiris, 2005).

Tabela 3. Grau de malignidade dos tumores mamários caninos (adaptado de Sorenmo et al., 2013).

Resultado (pontos)	Grau de Malignidade
3 a 5	I (baixo) - Bem diferenciado
6 a 7	II (intermédio) - Moderadamente diferenciado
8 a 9	III (alto) - Indiferenciado

Após todas estas considerações, é necessário enfatizar que os tumores mamários caninos podem, de facto, apresentar alguns desafios e dificuldades no que diz respeito ao diagnóstico (Peleteiro, 1994; Sorenmo et al., 2013). Existe um vasto espectro de entidades tumorais passíveis de ocorrer e as lesões benignas e malignas podem ter origem em diferentes tipos de tecido ou numa combinação de vários (Sorenmo et al., 2013). Como foi dito anteriormente, podem coexistir, no mesmo animal, múltiplos tumores mamários, que poderão ser de tipo histológico diferente e de tamanho variável, pelo que, para se ter o máximo de confiança no diagnóstico, deve-se sempre recolher e analisar várias áreas do tumor, procurando também abranger zonas de transição entre a neoplasia e os tecidos aparentemente são (Peleteiro, 1994; Sorenmo et al., 2013).

## 2.4. Tratamento

### 2.4.1. Tratamento cirúrgico

Em Medicina Veterinária, a cirurgia continua a ser o tratamento mais recomendado e utilizado, no que respeita aos tumores mamários caninos, excetuando-se os casos de carcinoma inflamatório, se o animal for muito velho, ou se existirem metástases à distância (Peleteiro, 1994; Misdorp, 2002; Macphail, 2013). A remoção cirúrgica pode ser curativa no caso das lesões benignas e para as malignas em, aproximadamente, 50% dos casos (Misdorp & Hart, 1979). No entanto, muitos desses animais (40 a 60%) poderão já ter micrometastases, não detetadas na altura do diagnóstico clínico (Misdorp, 2002). Independentemente disto, a remoção cirúrgica da massa poderá melhorar a qualidade de vida do animal (Macphail, 2013) e deve ser realizada o mais precocemente possível (Misdorp, 2002). A seleção da técnica cirúrgica depende do tamanho do tumor, localização, consistência, estado do paciente e preferência do cirurgião, podendo mesmo ser realizada uma combinação de várias técnicas, se o animal apresentar várias massas em ambas as cadeias mamárias (Misdorp, 2002; Macphail, 2013). É imperativo que todas as massas detetadas sejam removidas e, se isso for impossível com apenas uma cirurgia, deve-se

esperar três a quatro semanas até à próxima cirurgia, de modo a permitir a cicatrização e recuperação da elasticidade da pele. Se se optar por realizar a ovariectomia em paralelo, esta deve ocorrer antes da mastectomia para prevenir a entrada de células tumorais para a cavidade abdominal (Macphail, 2013). A influência do tratamento cirúrgico na prevenção de novos tumores mamários ainda não está totalmente clarificada mas pelo menos irá prevenir doenças uterinas, como a piómetra (Macphail, 2013). Segundo este autor, estão descritas as seguintes técnicas cirúrgicas para o tratamento cirúrgico dos tumores mamários caninos:

- a) **Lumpectomia ou Mastectomia Parcial:** corresponde à excisão de uma massa pequena (inferior a 5mm) e uma margem de segurança envolvente de tecido mamário normal, igual ou superior a 1cm. Apenas deve ser utilizada quando a massa é, de facto, pequena, encapsulada, não invasiva e se localiza à periferia da glândula. Pode ocorrer invasão de leite ou linfa pelos tecidos envolventes e isto causar inflamação e desconforto pós-operatório.
- b) **Mastectomia Simples:** corresponde à excisão de uma glândula mamária na sua totalidade. É realizada quando o tumor abrange a área central da glândula ou a maior parte da glândula. A remoção da totalidade da glândula pode facilitar o procedimento cirúrgico, previne uma reação inflamatória e o desconforto pós-operatório causado pela saída de leite ou linfa para os tecidos envolventes.
- c) **Mastectomia Regional:** este procedimento envolve a excisão de várias glândulas mamárias no mesmo ato cirúrgico. É selecionada quando ocorrem múltiplos tumores em glândulas adjacentes, na mesma cadeia mamária, ou quando a massa está presente entre duas glândulas adjacentes.
- d) **Mastectomia Unilateral:** realizada quando existem vários tumores dispersos numa cadeia mamária homolateral. Esta técnica é menos demorada e menos traumática do que se se optar pela realização de múltiplas lumpectomias ou mastectomias simples.
- e) **Mastectomia Bilateral/Radical:** este procedimento é escolhido quando existem várias massas em ambas as cadeias mamárias. Contudo, por ser um procedimento agressivo e a sutura de pele poder ser extremamente difícil de realizar, não é uma técnica muito recomendada. Em vez disso deve-se agendar duas mastectomias unilaterais.

Segundo Macphail (2013), a sobrevivência da cadela não é influenciada pela técnica cirúrgica escolhida, a menos que seja realizada uma excisão incompleta do tumor. Sempre que possível os linfonodos regionais devem ser removidos e enviados para análise histopatológica para avaliação da presença de metástases. Podem surgir complicações após a cirurgia e os donos devem prestar cuidados pós-operatórios que permitam a

recuperação rápida e indolor do seu animal. Entre as possíveis complicações pós-operatórias destaca-se a dor, inflamação, hemorragia, formação de seroma, infeção, necrose isquémica, auto trauma, deiscência, edema dos membros posteriores e recidiva tumoral (Macphail, 2013).

## **2.4.2. Tratamento adjuvante**

### **2.4.2.1 Quimioterapia**

A quimioterapia é frequentemente prescrita em cadelas com tumores invasivos (de grau II ou III) cujo risco de metastização e de recidiva é elevado (Sorenmo et al., 2013). Contudo, a eficácia desta terapia na cadela ainda não está totalmente esclarecida, ao contrário do que acontece na Mulher (Carolyn, 2009; Euler, 2011; Sorenmo, 2013). Os fármacos mais frequentemente utilizados na Mulher são: ciclofosfamida, doxorrubicina, gemcitabina e taxanos (Euler, 2011). Em cadelas com tumores invasivos, foi descrita uma influência positiva no tempo de sobrevida quando utilizadas combinações de 5-fluorouracil e ciclofosfamida em conjunto com a cirurgia (Karayannopoulou et al., 2001). No caso do uso de gemcitabina, não houve diferença significativa entre o grupo tratado apenas cirurgicamente e o grupo que, para além da cirurgia, foi tratado com este fármaco (Marconato, Lorenzo, Abramo, Ratto & Zini 2008). Foi estudado também o efeito do uso de doxorrubicina ou de docetaxel no tratamento adjuvante de tumores invasivos, sem que se tenha encontrado um benefício significativo (Simon, Schoenrock, Baumgartner & Nolte, 2006).

### **2.4.2.2 Radioterapia**

Embora seja muito prescrito para tratamento de certos subtipos de tumores mamários na Mulher, não foi ainda demonstrado que a radioterapia traga benefícios como tratamento adjuvante nos tumores mamários caninos (Euler, 2011; Misdorp, 2002). Devido à localização anatómica das glândulas mamárias na cadela, existe um risco elevado para o aparecimento de efeitos secundários à radiação, nomeadamente, no trato gastrointestinal (Euler, 2011). Apesar de serem necessários mais estudos para se perceber a influência da radioterapia no combate a esta doença, um dos maiores entraves ao seu uso prende-se com o facto de não existir um centro de radioterapia veterinária em Portugal ou em Espanha.

### **2.4.2.3 Terapia hormonal**

Devido às dificuldades em realizar, rotineiramente, testes para determinar o *status* dos recetores de estrogénio e de progesterona nos tumores mamários caninos, o uso de terapia hormonal, em Medicina Veterinária, é muito inferior ao que acontece em Medicina Humana

(Carolyn, 2009). Uma das opções mais antiga e mais utilizada na Mulher é o uso do tamoxifeno. Este fármaco é um modulador seletivo dos recetores de estrogénio e, por isso, atua em tumores positivos para recetores de estrogénio, prevenindo a estimulação adicional nas células tumorais por parte desta hormona (Stuart-Harris & Davis 2010). Num estudo efetuado por Morris, Dobson & Bostock (1993), foi testado o efeito do tamoxifeno em tumores mamários caninos, concluindo-se que este fármaco não apresentava o mesmo benefício observado na Mulher. Aliás, neste estudo, para a maioria das cadelas teve de se interromper a toma de tamoxifeno, devido aos inúmeros efeitos secundários registados. Atualmente, o uso de tamoxifeno não é aconselhado como tratamento adjuvante dos tumores mamários caninos (Carolyn, 2009; Euler, 2011).

A goserelina, um antagonista da GnRH, parece ser eficaz no tratamento de tumores hormono-dependentes na Mulher, já se tendo realizado, também, alguns ensaios clínicos com este fármaco, na cadela, com resultados promissores (Sleeckx, Rooster, Kroeze, Van Ginneken & Van Brantegem, 2011).

Existem, também, os antagonistas da progesterona (anti-progestinas) e moduladores dos recetores de progesterona. A sua eficácia tem vindo a ser estudada em Medicina Humana nos últimos anos (Sleeckx et al., 2011). Em Oncologia Veterinária, um estudo recente demonstrou que a aglepristona, um bloqueador dos recetores de progesterona, pode ter efeito benéfico no tratamento deste tipo de tumores, uma vez que foi registada uma redução significativa da proliferação das massas tumorais (Guil-Luna et al., 2011).

#### **2.4.2.4 Imunoterapia**

Nesta área foram testadas substâncias biológicas como as vacinas do BCG e *Corynebacterium parvum* sem sucesso (Misdorp, 2002). Recentemente foram estudadas vacinas do tipo DNA-EP e do tipo Ad6-based, que têm como alvo a transcriptase reversa da telomerase e a proteína HER-2. Foi demonstrado que a vacinação induzia uma resposta imunitária adaptativa relevante contra estes antígenos tumorais, sugerindo a necessidade de estudos posteriores para introdução desta vacina no tratamento de tumores mamários caninos (Peruzzi, Mesiti, Ciliberto, La Monica, & Aurisicchio, 2010). Existem também fármacos para imunoterapia específica na Mulher, com o propósito da interrupção da atividade do recetor HER-2, como o trastazumab, trastuzumab-DM1, pertuzumab, entre outros (Saini et al., 2011). Estes fármacos serão abordados, mais adiante, no capítulo dedicado ao HER-2.

#### **2.4.2.5 Outros Tratamentos Adjuvantes**

Existem outras terapêuticas em estudo como os inibidores da COX-2, o uso de desmopressina e os anticorpos anti-VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) como estratégia anti-angiogénica. Em relação aos inibidores da COX-2, o uso de piroxicam tem sido proposto como um potencial agente de tratamento e prevenção de tumores mamários mas, até a data, não foi demonstrado um benefício significativo deste fármaco (Sleekx et al., 2011). Em relação à desmopressina, o seu mecanismo antitumoral ainda não é totalmente conhecido mas sabe-se que esta previne a disseminação de células tumorais através da corrente sanguínea. Quando é administrada intravenosamente, a desmopressina induz a libertação do fator de von Willebrand (vWf). Foi demonstrado que este fator é capaz de provocar a apoptose de células tumorais *in vitro*. Em modelo murino foi, também, demonstrado que este fator diminui a disseminação de células tumorais, ao reduzir a aderência das células neoplásicas à microvasculatura (Sleekx et al., 2011). O bevacizumab (Avastin®) é um anticorpo monoclonal humanizado que tem como alvo o VEGF. Ao bloquear o VEGF, este anticorpo desenvolve uma ação anti-angiogénica e, por isso, antitumoral. Apesar de teoricamente estes fármacos poderem constituir uma boa alternativa no futuro, são necessários mais estudos para verificar a sua eficácia no tratamento adjuvante dos tumores mamários caninos (Sleekx et al., 2011).

### **2.5. Prognóstico**

Devido à complexa histogénese e ao comportamento biológico variável dos tumores mamários caninos, o prognóstico pode ser difícil de determinar, bem como, a influência de certos fatores neste (Dos Santos, 2012). Para além disso, em Medicina Veterinária, a eutanásia a pedido dos donos é algo frequente, o que torna difícil a determinação, com rigor, do tempo de sobrevida. Por esta razão, deve-se trabalhar com o período de ausência do processo neoplásico identificável – do inglês “*disease free interval*” – ou o risco de desenvolvimento de novas lesões neoplásicas (Peleteiro, 1994). Tendo isto em mente, descreve-se, de seguida, os principais fatores identificados, com influência significativa no prognóstico:

#### **2.5.1. Idade**

Ao contrário do que se sabe na Mulher, cuja idade avançada é considerada um fator de prognóstico negativo (Dos Santos, 2012), na cadela esta influência não está esclarecida. Alguns autores não encontram uma associação significativa (Chang et al., 2005; Shofer, Sonnenschein, Goldschmidt, Laster, & Glickman, 1989) mas, por outro lado, Perez-Alenza

(1997) refere, no seu estudo, que a idade avançada está associada a uma diminuição tanto na sobrevida como no período de ausência de processo neoplásico identificável.

### **2.5.2. Dimensão do tumor**

A dimensão do tumor é um fator importante no prognóstico (Sorenmo et al., 2013). Vários autores afirmam que as cadelas com tumores de diâmetro inferior a 3 cm têm um tempo de sobrevida mais longo que cadelas com tumores maiores (Kurzman & Gilbertson, 1986; Philibert et al., 2003; Martín de Las Mulas et al., 2005). Os tumores com diâmetro superior a 3 cm estão associados a um aumento do risco de recidiva (Kurzman & Gilbertson, 1986) e diminuição do período de ausência do processo neoplásico identificável (Martín de las Mulas et al., 2005). Outros autores consideram que só existe alteração no prognóstico quando o diâmetro do tumor é superior a 5cm (Morris et al., 1993; Yamagami et al., 1996b). A previsão de um prognóstico desfavorável é diretamente proporcional ao aumento do diâmetro do tumor (Yamagami et al., 1996b; Chang et al., 2005; Sorenmo et al., 2009). Foi também descrito que a ocorrência de metástases nos linfonodos regionais está estatisticamente relacionada com diâmetros superiores a 5cm (Chang et al., 2005).

### **2.5.3. Fase clínica do tumor**

Como referido anteriormente, a avaliação clínica vai proporcionar a classificação de cada tumor segundo o sistema TNM (Tumor, Linfonodo e Metástase) (Peleteiro, 1994; Sorenmo et al., 2013). Foi descrita uma correlação positiva entre os tumores em fases mais avançadas (3 a 5) e um prognóstico pior (Yamagami et al., 1996b; Philibert et al., 2003; Chang et al., 2005). Chang et al., (2005) determinaram que o período de sobrevida médio das cadelas com tumores em fase 4 ou 5 era de seis meses. Yamagami et al. (1996b) relataram que as taxas de sobrevivência para as fases 4, 3 e 1, um ano após mastectomia, eram 13,6%, 75,8 e 97,9%, respetivamente.

### **2.5.4. Metastização nos linfonodos**

A presença de metástases nos linfonodos regionais tem vindo a ser correlacionada positivamente com um prognóstico desfavorável, nos tumores mamários caninos (Kurzman & Gilbertson, 1986; Karayannopoulou et al., 2005). De acordo com Kurzman e Gilbertson (1986), o diâmetro do tumor primário deixa de ser significativo quando existe infiltração linfática regional, sendo que as cadelas com esta infiltração (fase 4 e 5) estão associadas a um prognóstico mais desfavorável do que as cadelas nas restantes fases clínicas da doença. Karayannopoulou et al. (2005) determinou uma taxa de sobrevivência, 2 anos após a mastectomia, de 20% para as cadelas que apresentavam os linfonodos infiltrados com

metástases e de 60% para as que não tinham metastização, ou seja, relacionando a presença de metástases nos linfonodos, também, com um pior prognóstico. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por outros estudos (Yamagami et al., 1996b; de Las Mulas et al., 2005).

#### **2.5.5. Tipo histológico e grau de malignidade**

Relativamente ao tipo histológico dos tumores mamários, a malignidade aumenta progressivamente desde os carcinomas *in situ* (não infiltrativos), passando pelos carcinomas complexos, pelos carcinomas simples bem diferenciados (tipo tubulopapilar), pelos carcinomas simples de tipo sólido, pelos carcinomas simples de tipo anaplásico, até aos sarcomas. Este aumento de malignidade é diretamente proporcional ao aumento da probabilidade de um prognóstico menos favorável (Yamagami et al., 1996b; Misdorp, et al 1999; Philibert et al., 2003). Estes dados são contrariados por alguns estudos onde não foi encontrada associação significativa entre o tipo histológico e o tempo de sobrevida (Pérez-Alenza, Peña, Nieto & Castaño, 1997) ou período de ausência de processo neoplásico identificável (de Las Mulas et al., 2005). Os sarcomas e os carcinosarcomas têm, respetivamente, um risco mais elevado de mortalidade e de desenvolvimento de metástases (Benjamin et al., 1999; Chang et al., 2005). Karayannopoulou et al. (2005) descreve a existência de diferenças significativas no tempo de sobrevida entre os tumores com diferentes graus de malignidade; o prognóstico é pior para os cães com carcinomas de grau III de malignidade, quando comparado com animais com tumores de grau I e II. Apesar de vários autores adotarem diferentes sistemas de classificação para a determinação do grau de malignidade é geralmente aceite que os tumores de grau I estão associados a um melhor prognóstico e, os de grau III, a um prognóstico mais desfavorável, sendo mais difícil de determinar quando são tumores de grau II de malignidade (Pérez-Alenza et al., 2000).

#### **2.5.6. Expressão de recetores hormonais**

A expressão dos recetores hormonais RP e RE parece estar correlacionada com um melhor prognóstico (Nieto et al., 2000; Martín de las Mulas et al., 2005; Chang et al., 2009). Segundo estes estudos, a expressão destes recetores é progressivamente inferior nas displasias/hiperplasias, nos tumores benignos e, por fim, nos tumores malignos. A presença de RE e RP nas metástases regionais e à distância é pouco frequente ou mesmo ausente, o que sugere que a perda de dependência hormonal é paralela à indiferenciação e à progressão dos tumores mamários caninos (Rutteman, Misdorp, Blankenstein & van den Brom, 1988).



## 2.6. Classificação Molecular dos Tumores Mamários

### 2.6.1. Classificação Molecular na Mulher

Como foi visto, a neoplasia mamária apresenta-se como uma doença complexa com entidades clínicas, morfológicas e moleculares muito distintas. Esta heterogeneidade e a ocorrência de tempos de sobrevida (ou período de ausência de processo neoplásico identificável) diferentes, em casos com prognóstico aparentemente semelhante, não conseguem ser explicadas, unicamente, pelos parâmetros clínicos como o tamanho tumoral, envolvimento dos linfonodos, grau de malignidade, idade ou pelos marcadores como os recetores de estrogénios (RE), recetores de progesterona (RP) e o recetor do fator de crescimento epidérmico do tipo II (HER-2). Face a este desafio, a comunidade científica, principalmente na área de Medicina Humana, focou-se em aprofundar o conhecimento da Biologia Molecular dos tumores mamários, utilizando a técnica de *microarrays* (*cDNA microarray*), uma vez que permite investigar a expressão de milhares de genes, numa só experiência e traçar o perfil molecular dos tumores mamários. Na viragem do século, Perou et al. (2000) publicaram um artigo científico onde subdividiam todos os tumores mamários da Mulher em quatro subtipos moleculares: Luminal, HER-2, Basal-like e Normal-like. Estudos posteriores dividiram o subtipo Luminal em dois subtipos (Luminal A e B) e recentemente foram adicionados novos subtipos à classificação original. Segue-se uma breve descrição da classificação molecular utilizada na Mulher, revista por Eroles, Bosch, Pérez-Fidalgo & Lluch (2012):

- a) **Luminal A:** é o subtipo mais comum. Representa cerca de 50-60% do total de tumores mamários. Caracteriza-se pela expressão de genes ativados pelo fator de transcrição RE, que são tipicamente expressos no epitélio de revestimento do lúmen dos ductos mamários. Todos os carcinomas lobulares *in situ* são deste subtipo. O perfil imunohistoquímico é caracterizado pela expressão de RE, RP, CK8/18 e Bcl-2; e pela ausência de expressão de HER-2 e uma baixa taxa de proliferação celular ( $Ki67 < 14\%$ ). Geralmente têm baixo grau de malignidade. Os pacientes apresentam um bom prognóstico com uma taxa de recidiva de 27.8% (tempo de sobrevivência mediana após a recidiva é de 2,2 anos). Padrão de recorrência distinto, com elevada incidência de metástases ósseas (18,7%), sendo as metástases no sistema nervoso central, fígado e pulmão inferior a 10%. O tratamento é baseado em inibidores da aromatase (AI) de 3ª geração, moduladores seletivos dos recetores de estrogénio (SERM's) – tamoxifeno; e reguladores seletivos puros dos recetores do estrogénio – fulvestrant.
- b) **Luminal B:** este subtipo tumoral representa 10-20 % do total e caracteriza-se por ter um fenótipo mais agressivo, pior prognóstico, grau histológico mais elevado e maior índice

de proliferação celular (ki67>14%) do que o Luminal A. A principal diferença biológica entre este subtipo e o luminal A é o aumento acentuado da expressão de genes de proliferação (MKi67, Ciclina B1) e também a expressão de EGFR e de HER-2. O perfil imunohistoquímico é caracterizado pela expressão de RE e ausência de expressão de HER-2 (semelhante a Luminal A mas com ki67>14%) ou expressão de RE e de HER-2. Cerca de 6% dos casos são RE/HER-2 negativos. O tempo de sobrevivência média após a recidiva é de 1,6 anos e os locais mais comuns de metástases são os ossos (30%) e o fígado (13,8%). O tratamento é baseado em tamoxifeno e inibidores da aromatase. Respondem melhor à quimioterapia neoadjuvante, atingindo-se uma resposta completa em 17 % dos tumores luminais B (7% nos A).

- c) **HER-2-positivo:** este subtipo ocorre entre 15 e 20% dos tumores mamários. Apresentam uma sobreexpressão de genes relacionados com a proliferação celular. Morfologicamente, estes tumores são altamente proliferativos, 75% possuem um grau histológico elevado e mais de 40% têm mutações no gene p53. O perfil imunohistoquímico é caracterizado pela sobreexpressão de HER-2 e ausência de expressão de RE e RP. Apesar de, no geral, apresentarem um prognóstico pior, os tumores HER-2-positivos foram subdivididos em três subtipos, já que um subtipo apresenta uma taxa de sobrevida a 10 anos de 12% e os outros dois 50-55%. Isto deu origem ao desenvolvimento de *array* composto por 158 genes (*HER-2-derived prognostic predictor*, HDPP) que permite uma melhor análise e estratificação dos tumores HER-2 em relação ao seu prognóstico. O tratamento anti-HER-2, com trastuzumab veio melhorar substancialmente a sobrevivência associada a este subtipo de tumores.
- d) **Basal-like:** representa 10-20 % do total dos tumores mamários e caracteriza-se pela ausência de expressão dos três principais recetores (RE, PR e HER-2). O nome deriva do facto de expressarem genes geralmente presentes nas células mioepiteliais do tecido mamário normal, incluindo CK5, CK17, P-caderina, caveolina 1 e 2, nestina, CD44 e EGFR. Clinicamente surgem numa idade precoce, tendo diâmetro elevado na altura do diagnóstico, um grau de malignidade elevado e uma frequência elevada de metastização nos linfonodos. Ocorre frequentemente nos carcinomas ductais infiltrativos. O padrão de metástases é muito agressivo com localização no pulmão, sistema nervoso e linfonodos. Têm elevada proliferação celular. O perfil imunohistoquímico caracteriza-se por ser RE-, RP-, HER-, EGFR+, CK5/17+, CK8/18+. Devido à ausência dos três principais recetores são por vezes denominados na prática clínica como “Triple Negative”. O subtipo Basal-like possui um prognóstico mais desfavorável que os Luminais, com uma taxa de recidiva mais elevada nos primeiros 3 anos, apesar de apresentarem boa resposta à quimioterapia. Estes tumores têm uma taxa elevada de mutações nos genes p53,

BRAC1 e BRAC2, o que pode estar relacionado com a maior agressividade e pior prognóstico. Uma das estratégias mais promissoras no tratamento destes tumores, e mais especificamente dos “Triple Negative”, é o uso de inibidores da poli-ADP ribosepolimerase-1 (PARP-1). A PARP-1 tem um papel vital na reparação de defeitos no ADN. A inibição da PARP-1, no contexto da reparação de ADN pelo BRCA1, leva à acumulação de erros no ADN e à morte celular. Estudos de fase I para avaliar o olaparib (AZD2281) como monoterapia nos tumores de mama com mutações BRCA1 e BRCA2 mostram uma taxa de resposta alta e um benefício clínico notório (47% e 63%, respetivamente).

- e) **Normal breast:** representa 5-10% de todos os tumores mamários. São tumores mal caracterizados. Expressam genes idênticos aos do tecido adiposo, tendo um prognóstico intermédio entre Luminais e Basal-like. Têm ausência de expressão de RE, PR e HER-2, podendo ser também classificados como “Triple Negative”. Não são considerados Basal-like por serem negativos para CK5. A sua importância clínica ainda não está claramente determinada uma vez que a sua ocorrência é rara e há poucos estudos sobre este subtipo. Geralmente não respondem a quimioterapia neoadjuvante. Existe algum ceticismo acerca da sua real existência e alguns investigadores acreditam que seja apenas um artefacto técnico, devido a uma possível contaminação elevada com tecido adiposo antes da realização dos *microarrays*.
- f) **Claudin-low** – este subtipo foi identificado em 2007. Representa 12-14% dos tumores mamários malignos, caracterizando-se por uma baixa expressão dos genes envolvidos nas junções celulares (tight junctions) e na adesão intercelular como a claudina-3, -4, -7, cingulina, ocludina e a E-caderina. Hierarquicamente é colocado perto do tipo Basal-like, devido a baixa expressão de RE, RP, HER. Em contraste, este novo subtipo expressa uma série de 40 genes relacionados com a resposta imunitária. Os tumores Claudin-low são caracterizados por uma baixa proliferação celular e um mau prognóstico (intermédio entre luminal e basal-like). Assim como nos Basal-like, a concordância entre Claudin-low e “Triple Negative” não é 100% e cerca de 20% destes tumores são positivos aos recetores hormonais. Mostram uma resposta fraca à quimioterapia neoadjuvante.

Esta classificação fornece informação vital para uma melhor compreensão acerca da intrínseca biologia dos tumores mamários. Apesar de ainda não ser totalmente aplicável à prática clínica, por razões de uniformização e de carácter económico, a classificação molecular dos tumores mamários alterou drasticamente a forma como esta neoplasia é estudada, diagnosticada e classificada, abrindo as portas para a investigação de novas estratégias para o seu tratamento (Eroles et al., 2012).

## **2.6.2. Classificação Molecular na Cadela**

Assim como na Mulher, vários investigadores tentaram, na última década, classificar molecularmente os tumores mamários caninos. Para além de vir melhor o conhecimento sobre a biologia tumoral, o prognóstico e a investigação de novas estratégias terapêuticas, este tema tornou-se, igualmente, motivo de interesse pela possibilidade de desenvolvimento de estudos na área da Oncologia Comparada (Gama, Alves & Schmitt, 2008).

Gama et al. (2008), baseando-se na classificação humana, utilizando 5 marcadores moleculares (RE, HER-2, CK5, p63 e P-caderina) através da técnica de Imunohistoquímica, classificou os carcinomas mamários caninos em quatro subtipos: Luminal A (13,5%), Luminal B (44,8%), Basal-like (29,2%) e HER-2-positivo (8,3%). Estes resultados refletem a heterogeneidade presente nos tumores mamários. Neste estudo, o subtipo Luminal A foi associado a um baixo grau de malignidade (I ou II), a baixa taxa de proliferação, estando mais presente em tumores do tipo complexo. Os subtipos Basal-like e HER-2-positivo estiveram mais frequentemente associados aos tumores de tipo simples e aos carcinosarcomas. O subtipo Basal-like foi o mais frequente em tumores de elevado grau de malignidade (III), com elevada taxa de proliferação e pior prognóstico. Apesar do subtipo HER-2-positivo estar relacionado com tumores de maior dimensão, grau de malignidade elevado e índice de proliferação elevada – indicadores de um pior prognóstico – as cadelas apresentaram uma evolução clínica mais favorável do que a reportada em estudos na Mulher (Perou et al., 2000). Isto poderá estar relacionado com a baixa quantidade de casos que foram identificados como HER-2 positivo, sugerem Gama et al. (2008).

Continuando o objetivo de verificar a adaptação da classificação molecular humana aos tumores mamários caninos, e ainda, determinar a percentagem dos vários subtipos e a sua correlação com o prognóstico, Sassi, Benazzi, C., Castellani e Sarli publicaram, em 2010, um estudo onde demonstraram a existência de 3 subtipos moleculares, Luminal A, Luminal B e Basal-like respetivamente. Para a deteção imunohistoquímica utilizaram um painel que consistia em 5 marcadores moleculares (RE, RP, HER-2, CK14 e CK5/6). Neste estudo não foi encontrado nenhum tumor HER-2-positivo, tendo os autores sugerido que poderá dever-se à pequena dimensão da amostra (45 casos) ou estar relacionado com fatores epidemiológicos. O subtipo Luminal A foi correlacionado com tumores do grau I e os do subtipo Luminal B com tumores do grau II e III. Estes resultados contrariam os de Gama et al. (2008), que correlacionaram apenas os tumores do subtipo Basal-like com o grau de malignidade. No estudo, Sassi et al (2010) referem ainda que a classificação molecular dos carcinomas mamários caninos terá interesse para determinar o grau de malignidade mas não a probabilidade de invasão metastática e a classificação morfológica. Também não foi

possível correlacionar o sistema de classificação molecular com o tempo de sobrevida, ao contrário do estudo de Gama et al. (2008) que associou o subtipo Basal-like com um período de sobrevida mais curto. Segundo Sassi et al (2010), as diferenças entre estes estudos podem ser explicadas pelos diferentes painéis de marcadores basais utilizados (CK5/6 e CK14 em oposição a CK5, p63 e P-caderina no estudo de Gama et al. (2008).

Mais recentemente, um estudo levado a cabo por Kim, Lim, Im, Kim e Sur (2012) teve como objetivo determinar se, nos tumores mamários caninos, existia distinção entre o subtipo Basal-like e o Triple Negative – distinção existente no cancro da mama na Mulher (Eroles et al., 2012). Para tal, a classificação foi baseada na expressão dos marcadores: RE, RP, HER-2, CK5/6, CK14, p63 e EGFR. Os tumores foram englobados em duas categorias: Triple Negative e Non-triple Negative. Os Triple-negative foram 18,7% dos 241 carcinomas mamários caninos presentes no estudo, enquanto os non-triple-negative os restantes 81,3%. Dos 18,7% Triple Negative, 91,1% pertenciam ao subtipo Basal-like e 8,9% ao subtipo Normal breast, semelhante aos resultados obtidos na Mulher (Cheang et al., 2008). Os resultados de Kim et al. (2012) sugerem que o subtipo Basal-like está correlacionado com tumores mais agressivos e de pior prognóstico.

Estes resultados sugerem que deve haver cautela na aplicação da classificação molecular, utilizada na Mulher, aos tumores mamários caninos e que é necessário realizar mais estudos nesta área (Gama et al. 2008; Sassi et al., 2010; Kim et al., 2012) Os estudos anteriores apoiam a ideia de que os tumores mamários da cadela se assemelham molecularmente aos da Mulher, mas para que a comparação seja segura deve-se identificar e comparar grupos homogêneos de tumores mamários (Sassi et al., 2010). São também necessários mais estudos para avaliar o valor de prognóstico destes subtipos (Gama et al., 2008) e é necessário confirmar a existência do subtipo Basal-like como entidade separada nos tumores mamários caninos (Kim et al., 2012).

### 3. Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico Tipo II

As alterações no proto-oncogene HER-2/neu, também denominado HER-2 ou c-ErbB-2 (Schechter et al., 1984; Coussens et al., 1985; Semba, Kamata, Toyoshima & Yamamoto, 1985) têm sido alvo de grande atenção por parte da comunidade científica, devido à sua potencial utilidade clínica como um indicador de prognóstico e alvo de tratamento molecular específico (Press et al. 2002; Saini et al., 2011).

#### 3.1. Estrutura Molecular

Nos humanos, este proto-oncogene está localizado no cromossoma 17q21.1, compreende 27 exões codificantes e codifica uma glicoproteína transmembranar de 185 kDa, denominada HER-2 ou erbB-2, que pertence à família dos recetores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Akiyama, Sudo, Ogawara, Toyoshima & Yamamoto, 1986). Esta família é composta por quatro proteínas transmembranares (HER1, HER-2, HER3 e HER4), que funcionam como recetores, apresentando atividade tirosina-cinase, e que são compostas por três domínios: o extracelular, o transmembranar e o intracelular (Kraus, Issing, Miki, Popescu & Aaronson, 1989). O domínio extracelular é composto, por sua vez, por quatro subdomínios: L1, CR1, L2 e CR2 (I, II, III, IV), que se dispõem numa repetição em tandem de 2 unidades, separadas por resíduos ricos em cisteína. Este domínio extracelular contém um local de ligação para o ligando e regula a dimerização induzida por este. O domínio transmembranar é composto por uma hélice  $\alpha$  de natureza hidrofóbica. O domínio intracelular é formado por uma região citoplasmática com um domínio altamente conservado e uma cauda C-terminal regulatória (Kraus et al., 1989; King & Robins, 2006). Este domínio apresenta atividade tirosina-cinase e os locais para autofosforilação que a regulam. Na figura 3 encontra-se uma representação esquemática da proteína HER-2.

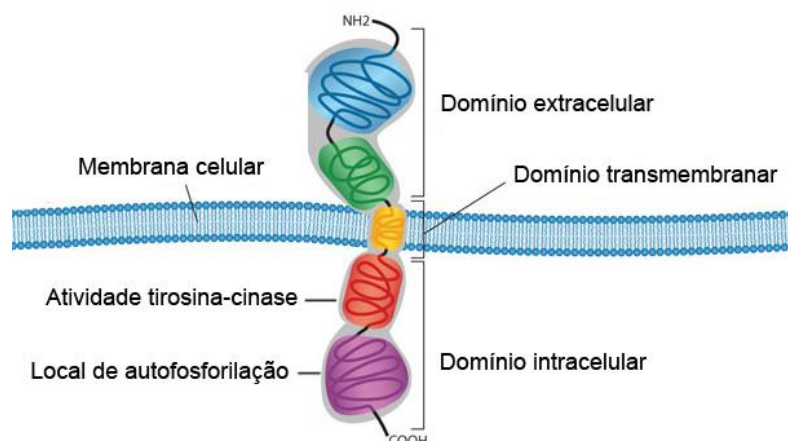


Figura 3: Estrutura molecular da proteína HER-2 (adaptado de Jablonski L., 2008)

Nos cães, o gene HER-2 está localizado no cromossoma 1q13.1 (Murua Escobar, Becker & Bullerdiek, 2001) e o seu mRNA com 3726 nucleótidos (GenBank: EU239096.1) codifica para uma proteína com 1242 aa (GenBank: ABW99113.1). Foi descrita uma homologia de 92% entre o recetor HER-2 humano e o canino (Singer et al., 2012).

### 3.2. Mecanismo de Ação

Os recetores da família HER possuem atividade tirosina-cinase e podem encontrar-se sob a forma de monómeros ou dímeros. A forma monomérica ocorre quando o recetor se encontra no seu estado inativo. Para haver dimerização, e consequente ativação do recetor, é necessária a união de um ligando ao domínio extracelular do recetor (Gutierrez & Schiff, 2011) (Figura 4). Foram identificados vários ligandos que ativam os recetores da família HER, nomeadamente, o EGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$ , neuregulinas, anfiregulina, epiregulina, betacelulina, heregulina (Hynes & Lane, 2005; Gutierrez & Schiff, 2011). Através desta dimerização ocorre uma reação de fosforilação dos resíduos tirosina presentes na cauda C-terminal, do domínio intracelular. Em cada membro da família HER existem vários locais com capacidade de fosforilação dos resíduos de tirosina, variando este número entre 19 no HER-2 a 27 no HER4. Nestes locais é também possível a ligação de moléculas sinalizadoras intracelulares que amplificam o sinal da cascata de sinalização iniciada pela dimerização dos recetores (Browne, O'Brien, Duffy, Crown & O'Donovan, 2009). As três vias de sinalização melhor caracterizadas são a Ras-MAPK, PI3K-PKB/Akt e a PLC-PKC. Os fatores de transcrição ativados por estas vias vão regular vários genes envolvidos em processos celulares como a divisão, migração, adesão, angiogénese, diferenciação e apoptose (Benusiglio, 2007; Zhang et al., 2007).

O recetor HER-2 não possui ligando específico e, por isso, para ser ativado necessita de sofrer heterodimerização com outro membro da família HER ou homodimerização (HER-2-HER-2), que ocorre espontaneamente quando este é expresso em níveis elevados (Gutierrez & Schiff, 2011). Nos processos de heterodimerização, o HER-2 é o par preferencialmente escolhido pelos outros membros da família HER, devido à sua conformação estrutural que expõe permanentemente os domínios de dimerização (Daly et al., 1997; Pal & Pegram, 2007). Paralelamente, o HER-2 é o recetor da família que possui maior atividade de tirosina-cinase e, consequentemente, os dímeros que o contêm conseguem gerar sinais intracelulares mais intensos (Yarden, 2001). Esta potenciação de sinal pode ser conseguida graças ao aumento da afinidade pelo ligando (reduzindo a taxa de dissociação do ligando), ao melhor emparelhamento com as vias de sinalização e à diminuição da taxa de *downregulation* do próprio recetor (Pinkas-Kramarski et al., 1996; Jones, Akita, & Sliwkowski, 1999).

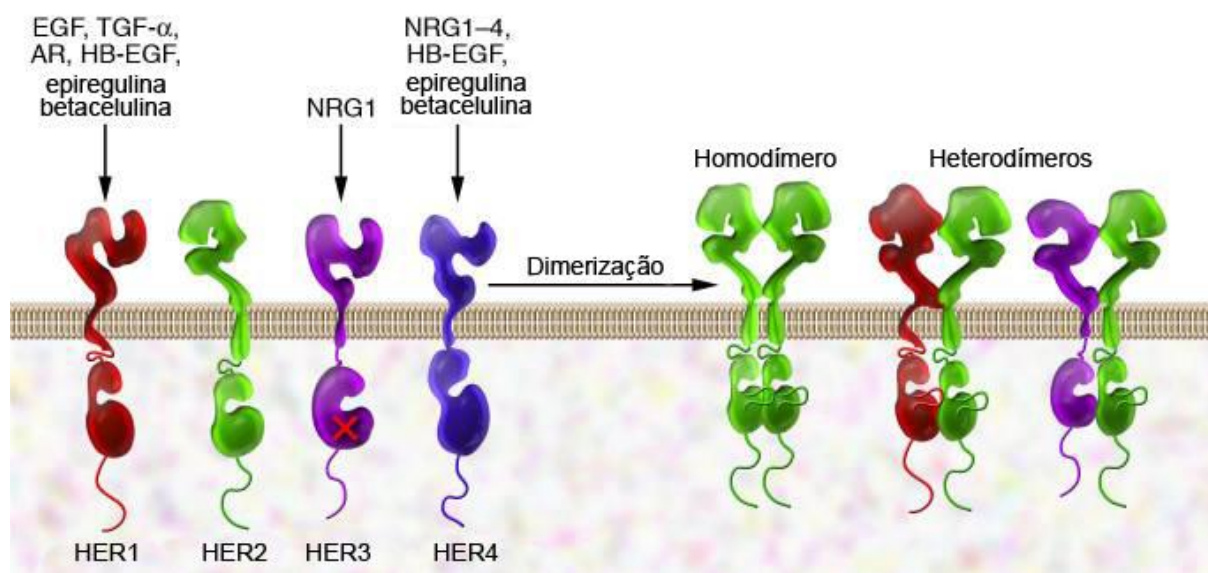


Figura 4. Recetores da família HER e seus ligandos (adaptado de Zhang et al., 2007). Nesta figura pode-se verificar a homologia entre os vários recetores da família HER, relativamente aos domínios extra e intracelulares. Na figura constam apenas alguns dos dímeros possíveis. O HER3 não possui atividade tirosina-cinase e ainda não foram identificados ligandos para o HER-2.

### 3.3. Papel no Desenvolvimento Celular

Sabe-se hoje que a expressão do HER-2 e as vias de sinalização mediadas por este recetor têm um papel importante no metabolismo celular e no desenvolvimento de determinados órgãos. A expressão de HER-2 foi detetada nas membranas celulares das células epiteliais gastrointestinais, na pele, na placenta, no aparelho reprodutor, no rim e na glândula mamária (Press, Cordon-Cardo, & Slamon, 1990). Foi também detetada expressão no sistema nervoso, osso em desenvolvimento, músculo, pele, coração, pulmão e no epitélio intestinal de fetos humanos (Coussens et al., 1985; Quirke, Pickles, Tuzi, Mohamdee & Gullick, 1989). Estudos posteriores demonstraram que os ratinhos que tinham ausência do gene HER-2, HER-3 ou HER-4 morriam durante a embriogénese, devido a defeitos no desenvolvimento do cérebro ou anomalias cardíacas graves (Gassmann et al., 1995; Finkle et al., 2004; Browne et al., 2009). Foi também encontrada expressão de HER-2 em cardiomiócitos de ratinho adulto, apresentando este recetor um papel essencial no normal funcionamento destas células (Garratt, Ozcelik & Birchmeier, 2003); segundo este estudo, a ausência da expressão de HER-2 causou cardiomiopatia dilatada. Esta função do HER-2 nos cardiomiócitos adultos normais tem efeitos secundários durante as terapias anti-HER-2 (Browne et al., 2009). Foi demonstrado que o HER-2 tem um papel importante nas primeiras fases do desenvolvimento da glândula mamária; a interrupção da função deste recetor conduz a uma diminuição no crescimento do sistema túbulo-alveolar durante a puberdade, apesar de não afetar a lactogénese (Andrechek, White & Muller 2005).



### 3.4. HER-2 e os Tumores Mamários

A amplificação do gene HER-2 nos tumores mamários foi inicialmente identificada por Slamon et al. (1987) e, posteriormente, esta amplificação foi correlacionada com a sobreexpressão do recetor HER-2 tanto a nível do ARN mensageiro como da proteína (Slamon et al., 1989). Na Mulher, foi determinado que o HER-2 se encontra amplificado ou sobreexpresso em 20 a 30% dos tumores mamários e que esta alteração está associada com o aumento da agressividade tumoral, das recidivas e da mortalidade (Press et al., 2002; Wolff et al., 2007). Foi também descrito que 40% dos carcinomas inflamatórios são do subtipo HER-2-positivo (Zell, Tsang, Taylor, Mehta, & Anton-Culver, 2009).

Os tumores mamários que sobreexpressam HER-2 estão associados às seguintes características: taxa de proliferação mais elevada; elevado grau de malignidade; diminuição da quantidade de recetores de estrogénio e de progesterona; maior percentagem de aneuploidia; maior propensão para metastizar no sistema nervoso central e vísceras; resistência a terapia endócrina e resposta positiva à terapia com anticorpos específicos anti-HER-2 (Gutierrez & Schiff, 2011). Ao longo das últimas décadas foram descritos alguns dos processos responsáveis pela excessiva ativação da cascata de sinalização controlada pelo HER-2, sendo estes, a sobreprodução de ligandos e de recetores nas células tumorais, criando uma secreção autócrina contínua; o crescimento dependente de ligandos produzidos pelas células do estroma adjacente (Salomon, Brandt, Ciardiello & Normanno, 1995); e o aumento da facilidade de autofosforilação do HER-2 causado por mutações/polimorfismos no gene HER-2 (Benusiglio et al. 2005; Jo et al., 2008).

A sequência genética do gene HER-2 tem sido alvo de vários estudos com o objetivo de se determinar quais as mutações pontuais com relevância clínica. Foi detetado um polimorfismo de nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) no codão 655 (Ile655Val), o que implica a substituição do par de base guanina por adenina na região codificante do domínio transmembranar (Papewalis, Nikitin & Rajewsky, 1991). Este polimorfismo foi identificado em 6% dos tumores mamários malignos e em 7% de Mulheres saudáveis, na Europa (Nelson, Gould, Hampton & Trentham-Dietz, 2005). Segundo este estudo, o polimorfismo encontrado está associado a um risco de desenvolvimento de tumor mamário baixo. Benusiglio et al. (2005) também não encontraram associação estatisticamente significativa entre este polimorfismo e a predisposição para o desenvolvimento de tumor mamário.

A amplificação do gene HER-2, e consequente sobreexpressão proteica, dá origem a um aumento significativo destes recetores na membrana celular e, por consequência, ao

aumento da formação dos heterodímeros e homodímeros de HER-2 (Moasser, 2007). Enquanto heterodímero, o HER-2 promove a potenciação das reações celulares devido à sua capacidade em contrariar os mecanismos de atenuação celular. Este recetor possui uma taxa de endocitose relativamente baixa e é capaz de provocar o mesmo efeito no recetor HER1, levando à diminuição da taxa de degradação de ambos (Sorkin, Di Fiore, & Carpenter, 1993; Baulida, Kraus, Alimandi, Di Fiore, & Carpenter, 1996). Pode também aumentar a taxa de reposição do HER1 e reduzir a sua degradação lisossomal (Lenferink et al., 1998; Worthylake, Opresko, & Wiley, 1999). O heterodímero HER-2/HER1 tem um papel fundamental na indução da capacidade de invasão às células neoplásicas através da membrana basal, sendo esta indução mediada pelas vias de sinalização PI3K, MAPK e pela fosfolipase Cy1 (Zhan, Xiang, & Muthuswamy, 2006; Browne et al., 2009).

Devido ao prognóstico desfavorável dos tumores HER-2-positivos, e à possibilidade de tratamento específico anti-recetor HER-2, a determinação do seu *status* é frequentemente realizada na Mulher (Gutierrez & Schiff, 2011). Esta determinação pode ser realizada através de técnicas de hibridação, como a Hibridação Florescente *In Situ* (FISH), a Hibridação Cromogénica *In Situ* (CISH) e a Hibridação com “Enriquecimento pela Prata” *In Situ* (SISH); através da quantificação do ARN mensageiro pela técnica de qRT-PCR; ou pela quantificação da proteína pela técnica de imunohistoquímica (IHQ).

A Imunohistoquímica é um método aceite pela *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) (Wolff et al. 2007), de realização relativamente fácil e amplamente utilizado, apesar de poder ter algumas desvantagens, que poderão pôr em causa a sua eficácia. Os resultados são, por vezes, afetados por variações na metodologia, tais como: o armazenamento inadequado das amostras, as variações no tempo de fixação dos tecidos, a utilização de diferentes anticorpos, a falta de competências técnicas, e, também, pela variação pessoal na interpretação dos resultados (Wolff et al. 2007; Park et al., 2011).

A Hibridação Florescente *In Situ* permite a quantificação direta do número de cópias de um determinado gene, com recurso a sondas e, por isso, é um método mais quantificável que a IHQ (Park et al., 2011). A desvantagem deste método reside no facto de ser necessário equipamento especializado, como um microscópio de fluorescência com filtros multicolor e sondas de hibridização que produzam fluorescência, o que o impede o seu uso mais frequente (Park, Kim, Lim, Han, & Lee, 2003). Na figura 5 pode-se ver um exemplo do resultado de FISH num tumor mamário HER-2+.

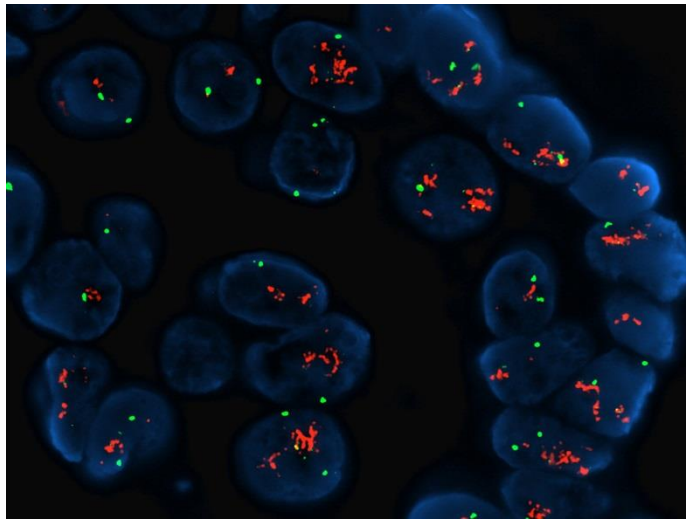


Figura 5. Resultado da técnica de FISH em tumor mamário de Mulher (adaptado de East of Scotland Regional Genetics Service, 2003). Nesta imagem pode observar-se a amplificação do gene HER-2 através da técnica de FISH (400x).

A Hibridação Cromogénica *In Situ* é um método que permite ultrapassar a necessidade de equipamento mais sofisticado que a FISH necessita, visto a revelação basear-se numa reação semelhante à IHQ, com a utilização de peroxidase. Este método permite, adicionalmente, uma avaliação histológica simultânea ao contrário da FISH (Tanner et al., 2000; Park et al., 2003). Na figura 6 pode-se ver o exemplo de um resultado de CISH, de um tumor mamário HER-2+.

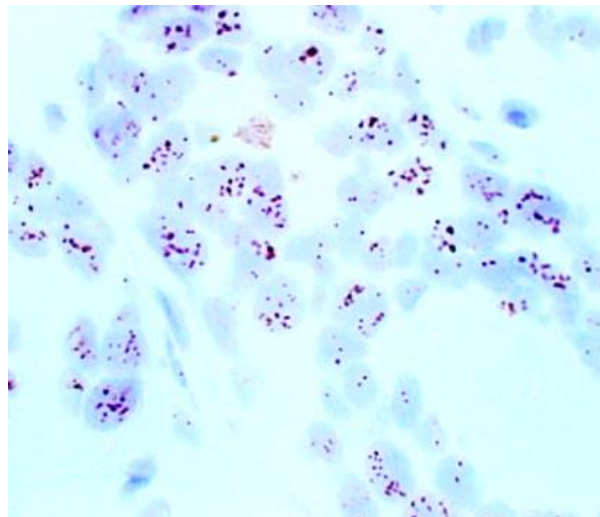


Figura 6. Resultado da técnica de CISH em tumor mamário de Mulher (Adaptado de Tanner et al., 2000). Nesta imagem pode-se ver a amplificação do gene HER-2, aparecendo como aglomerados de pontos peroxidase-positivos (H&E como contraste, 600x).

A Hibridação com “Enriquecimento pela Prata” *In Situ* é um método semelhante à CISH mas tem a vantagem de ser totalmente automatizado e permitir a quantificação do HER-2 em apenas 6 horas. As lâminas resultantes da hibridação permanecem estáveis, podendo ser

permanentemente arquivadas e avaliadas em microscópios óticos convencionais, o que também possibilita a avaliação histológica do tecido em simultâneo (Park et al., 2011). Foi identificada uma concordância de 98,9% entre a FISH e a SISH, o que justifica, aliado à sua praticabilidade, a utilização deste método na quantificação mais rotineira do gene HER-2 (Papouchado et al. 2010). Na figura 7 pode-se observar um exemplo de amplificação génica através da técnica de SISH aplicada num tumor mamário HER-2+.

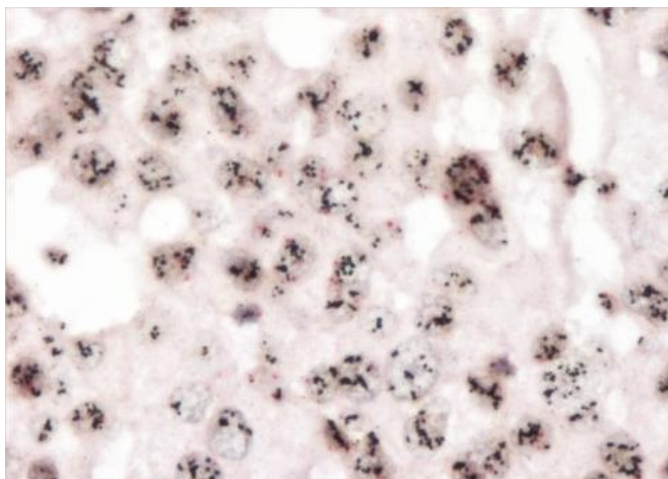


Figura 7. Resultado da técnica de SISH em tumor mamário de Mulher (adaptado de Park et al., 2011). Nesta imagem pode-se verificar o aumento das cópias do gene HER-2, através da técnica de SISH (400x).

#### 3.4.1. Fármacos Anti-HER-2

Com o aprofundamento do conhecimento sobre o HER-2, foi possível desenvolver vários fármacos com o objetivo de tentar travar as consequências da sobreexpressão deste recetor no processo neoplásico (Saini et al., 2011). Isto foi possível porque o HER-2 é expresso em níveis reduzidos no tecido mamário normal, diminuindo assim o risco de alterar as células normais (De Potter et al., 1995). Apresenta-se, de seguida, uma breve descrição dos principais fármacos desenvolvidos até hoje, revista por Saini et al. (2011):

**Trastuzumab (Herceptin®):** O trastuzumab foi o primeiro fármaco desenvolvido para intervir na via do HER-2. É um anticorpo monoclonal humanizado que se liga ao IV domínio na região justamembranar do domínio extracelular do HER-2 e inibe o crescimento de células tumorais *in vitro* e *in vivo* através de vários mecanismos. Estes incluem a clivagem do domínio extracelular, a ativação de citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC), a inibição da sinalização intracelular, a redução da angiogénese e diminuição da reparação do ADN. O principal mecanismo pelo qual o trastuzumab interrompe a sinalização do HER-2 é através do desacoplamento dos complexos HER-2/HER3/PI3K na ausência de ligandos. Muitos investigadores sugerem que a eficácia do trastuzumab se deve pelo menos, em

parte, à indução da resposta imunitária contra a proteína HER-2. O trastuzumab tem a capacidade de se ligar ao recetor do fragmento C (FcγR) presente nos macrófagos e nas células NK. O tratamento com trastuzumab também mostrou provocar a apoptose celular em pacientes com cancro da mama local avançado. A introdução do trastuzumab no tratamento do cancro da mama foi um grande passo na ciência. Vários estudos demonstraram que este fármaco, combinado com a quimioterapia, aumentava significativamente a taxa de resposta, a duração de resposta e o tempo de regressão da doença, com uma significativa redução do risco de mortalidade (20%). Estudos recentes que combinam o trastuzumab e inibidores da aromatase têm vindo a demonstrar uma boa sinergia e eficácia. A adição do trastuzumab como adjuvante na quimioterapia resultou também numa redução do risco de recidiva e de morte de 50% e 30%, respetivamente. Estes resultados levaram a aprovação deste fármaco como adjuvante na quimioterapia do cancro mamário recente ou em fase avançada. A toxicidade cardíaca é o principal efeito secundário deste fármaco, devido ao papel essencial do HER-2 no desenvolvimento cardíaco embrionário e à sua importância no crescimento, sobrevivência e inibição da apoptose nos cardiomiócitos. Apesar de existir um risco de 16% para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva, este é aceitável tendo em conta a eficácia deste fármaco. Devido ao seu custo comercial, ao risco de cardiotoxicidade e à possibilidade de resistência tumoral, o maior desafio é identificar os pacientes que terão benefício com a sua aplicação. A experiência clínica já demonstrou que vários pacientes mostram resistência ao trastuzumab e, por isso, serão necessários novos fármacos. Para além destes inconvenientes no uso do trastuzumab, foi descrita em 1998 uma forma aberrante do HER-2, a proteína p95HER-2 (Christianson, 1998), presente em cerca de 23% dos tumores mamários malignos da Mulher (Christianson, 1998; Scaltriti et al., 2007). Esta proteína não possui domínio extracelular, o que causa resistência tumoral ao trastuzumab e dificuldade de diagnóstico por anticorpos cujo alvo seja este domínio. Apesar de não possuir domínio extracelular, a p95HER-2 consegue desencadear as mesmas reações metabólicas nas células tumorais como a proteína HER-2 normal, tornando-se assim num alvo para a procura de novas formas de tratamento (Christianson, 1998; Scaltriti et al., 2007).

**Lapatinib (Tykerb®):** é um potente inibidor reversível da atividade tirosina-cinase que se liga aos domínios intracelulares do HER1 e do HER-2. Apesar de inibir a autofosforilação e as vias de sinalização do HER-2, o principal efeito anti tumoral do lapatinib parece estar relacionado com a redução da quantidade de survivina (proteína da família dos inibidores da apoptose). Ao contrário do trastuzumab, o lapatinib é uma molécula de pequeno tamanho, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e, por isso, atuar nas metástases cerebrais. A cardiotoxicidade parece também ser menor, com apenas 0,2% dos pacientes a mostrar redução na capacidade de ejeção ventricular esquerda. O lapatinib está também associado a uma alta incidência de diarreia, toxicidade hepática e cutânea, principalmente,

sob a forma de *rash* cutâneo. A diarreia é o efeito secundário mais comum, em cerca de 60% dos pacientes, quando o lapatinib é administrado em conjunto com a quimioterapia clássica. Como não há resistência cruzada entre o trastuzumab e o lapatinib poderá usar-se uma combinação dos dois, a qual irá ter efeito nas mesmas vias de sinalização e ultrapassar a resistência potencial de cada um deles.

**Pertuzumab (Perjeta®):** é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante que se liga ao domínio II do recetor HER-2, inibindo assim a heterodimerização deste com o HER1, HER3 e o HER4. O bloqueio do dímero HER-2-HER3 é, clinicamente, a ação mais relevante do pertuzumab, e isto pode, efetivamente, bloquear a sinalização celular mediada pelo HER-2. A eficácia deste fármaco como agente único em tumores HER-2-negativo é muito limitada. Assim como com o lapatinib, está em estudo o uso de combinações entre o pertuzumab e o trastuzumab, com resultados promissores até a data.

**Trastuzumab-DM1 (Kadcyla®):** consiste na conjugação de um anticorpo monoclonal anti-HER-2 com um agente citotóxico, dirigindo assim especificamente a citotoxicidade às células neoplásicas. Neste caso, o trastuzumab é conjugado com emtansine, um fármaco com ação antimicrotubular, que se liga à tubulina celular através de um ligando, o N-maleimidometil-ciclohexano-1-carboxilato (MCC). Este fármaco tem demonstrado uma eficácia clínica promissora e uma toxicidade aceitável. A ativação da citotoxicidade implica a internalização celular do anticorpo, que ocorre após a sua ligação ao HER-2. O conjugado que não é internalizado permanece inativo, o que limita a toxicidade sistémica do fármaco. No T-DM1, o transtuzumab para além de funcionar como um veículo para levar a toxicidade às células neoplásicas, mantém, também, as suas propriedades anti-tumorais inerentes. Este fármacomostra alguns efeitos secundários menores como a diarreia e as náuseas.

**Neratinib:** o Neratinib/HKI-272 é um inibidor irreversível do HER1, do HER-2 e do HER4 tomado por via oral. Após vários testes clínicos, foi descrita diarreia, náusea, vômito e fadiga como efeitos secundários comuns. Encontra-se atualmente em ensaios clínicos.

**Afatinib (Gilotrif®):** o Afatinib/BIBW 2992 é também um inibidor irreversível do HER1 e do HER-2. Foram descritos vários efeitos secundários como a diarreia, náusea, vômito, fadiga e rash cutâneo. Foi ainda demonstrada alguma atividade em tumores HER-2-negativos e ER-positivos, nas mulheres refratárias ao trastuzumab. Encontra-se atualmente em ensaios clínicos.

**Inibidores da Hsp90 (Proteína de choque térmico 90):** a Hsp90 é uma proteína chaperona que promove o enrolamento, maturação, conformação e estabilidade da proteína

HER-2 e dos seus substratos subsequentes como o Raf e Akt. Os inibidores da Hsp90 como a geldanamicina, e o seu derivado tanespimicina/17-AAG, possuem propriedades anti-tumorais por conseguirem diminuir a quantidade das proteínas que necessitam da Hsp90, como o HER-2. A Hsp90 é fortemente expressa em todas as células mas, os seus inibidores mostram-se seletivos porque a Hsp90 das células tumorais tem 100 vezes mais afinidade à tanespimicina/17-AAG do que a Hsp90 das células normais. Ainda assim, o tratamento com estes inibidores acarreta efeitos secundários como o vômito, aumento da ALT, reações de hipersensibilidade e trombocitopenia induzida.

### **3.5. Avaliação do HER-2 nos Tumores Mamários Caninos**

Nas últimas décadas, o interesse pela área de oncologia comparada cresceu e a possibilidade do uso dos tumores mamários caninos como modelo para estudos do cancro da mama da Mulher tem despertado grande interesse. Surgiu então a necessidade de caracterizar a expressão do HER-2 nestes tumores, de investigar a sua relação com o prognóstico e, mais recentemente, de investigar a utilização desta molécula para o desenvolvimento de novos fármacos anti-HER-2, com benefícios tanto para a Medicina Humana como para a Medicina Veterinária.

Utilizando a técnica de IHQ foi detetada sobreexpressão proteica de HER-2 nos carcinomas mamários caninos (Martín de las Mulas, Ordás, Millán, Fernández-Soria & Ramón y Cajal, 2003; Dutra, Granja, Schmitt, & Cassali, 2004; Gama et al 2008; Hsu, Huang, Liao, Wong & Chang, 2009; Kim et al, 2011; Singer et al., 2012). Os valores de sobreexpressão obtidos por estes investigadores foram: 8,3% (Gama et al., 2008), 17% (Martín de las Mulas, 2003), 29,7% (Hsu et al., 2009), 35,4% (Dutra et al., 2004), 35,3% (Kim et al., 2011) e de 40% (Singer et al, 2012). Estes autores justificam a variação de valores encontrada com diferentes metodologias de preparação da amostra, reduzida dimensão das amostras e fatores epidemiológicos. Num estudo que não avaliou a sobreexpressão do HER-2 a nível proteico mas sim ao nível do ARN mensageiro, foi verificado que o transcrito específico estava aumentado em 74% dos tumores mamários malignos caninos (Ahern, Bird, Bird & Wolfe, 1996).

A correlação entre a sobreexpressão de HER-2 e o prognóstico ainda não está totalmente esclarecida para esta espécie. No entanto, vários estudos apontam para uma correlação positiva entre estes dois fatores (Ahern et al., 1996; Martín de las Mulas et al., 2003; Dutra et al., 2004; Gama et al., 2008). Estes estudos associaram os tumores HER-2-positivos com indicadores de mau prognóstico como, por exemplo, elevada dimensão do tumor, presença predominante do tipo histológico simples, grau de malignidade elevado (III), e ausência de

expressão de recetores hormonais. Contudo, Ahern et al. (1996) demonstraram não haver correlação entre a presença deste tipo de tumor e invasão local ou doença metastática, facto contrariado por Martín de las Mulas (2003). Pelo contrário, Hsu et al. (2009) determinaram que a sobreexpressão de HER-2 está correlacionada com um prognóstico mais favorável; neste estudo, as cadelas com tumor HER-2-positivo apresentaram uma taxa de sobrevida de dois anos após a mastectomia, superior às cadelas cujos tumores tinham expressão normal de HER-2. Recentemente foi associado a subexpressão de beclina-1, uma importante proteína associada ao mecanismo de autofagia, com tumores mamários caninos mais agressivos e com a subexpressão de HER-2 (Liu, Chang, Lo, Chu, & Liu 2013)

Martín de las Mulas et al. (2003) recorrendo à técnica de CISH tentaram determinar se existia amplificação do gene HER-2 nos carcinomas caninos com *score* 3+, classificados de acordo com o HercepTest da DAKO. Este estudo não identificou qualquer amplificação nesses tumores e os autores sugerem que os carcinomas mamários caninos poderão servir de modelo natural para os tumores na Mulher com sobreexpressão proteica sem amplificação do gene HER-2.

Recentemente e com o objetivo de compreender melhor a utilização dos anticorpos anti-HER-2 humanizados nos tumores mamários caninos, Singer et al. (2012) analisaram a homologia entre a molécula de HER-2 humana e a canina, tendo encontrado uma semelhança de 92% entre as duas moléculas. Este estudo revelou também que o local de ligação do trastuzumab ao HER-2 canino é igual ao seu homólogo humano, com a exceção de um aminoácido. O facto de o trastuzumab reconhecer o epítopo do HER-2 canino, e este ser molecularmente semelhante ao seu homólogo humano, incentiva o desenvolvimento de novos fármacos e de novas estratégias para o tratamento dos tumores mamários caninos HER-2+ (Singer et al. 2012).

## **II. Objetivos do Trabalho Experimental**



O trabalho experimental, descrito nesta dissertação de mestrado, teve no seu planeamento vários objetivos:

- Devido à multiplicidade de protocolos de IHQ descritos na literatura veterinária, e consequente disparidade de resultados no que toca à percentagem de tumores mamários caninos com sobreexpressão, foram testados, em paralelo, vários protocolos experimentais de forma a otimizar a deteção deste recetor através da técnica de imunohistoquímica;
- Na Mulher, os tumores HER-2-positivos estão correlacionados com maior agressividade tumoral e prognóstico reservado. A existência da mesma correlação nos tumores mamários caninos não foi, até à data, clarificada e, por isso, este estudo tentou esclarecer esta questão e caracterizar o cenário epidemiológico dos TMC-HER-2+;
- Por último, este trabalho experimental pretendeu ajudar a validar um novo modelo biológico que possa ser empregue na investigação de tumores mamários HER-2+ na Mulher. A ser utilizada, a Oncologia Comparada permitirá um aprofundamento no conhecimento desta doença e o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e tratamento deste subtipo tumoral, tanto em Medicina Humana como na Medicina Veterinária.

### **III. Material e Métodos**

#### **1. Amostragem**

##### **1.1. Recolha e Processamento**

Para se proceder a este estudo foram acompanhados vinte e dois procedimentos cirúrgicos, efetuados no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, entre 23 de outubro de 2012 e 25 de janeiro de 2013. Estes procedimentos foram todos efetuados em fêmeas.

O material resultante da excisão cirúrgica (massa neoplásica e linfonodos regionais) foi prontamente colocado em recipiente próprio, ao qual foi adicionado formol tamponado a 10%, até estar completamente submerso. Posteriormente, decorreu a fase de fixação dos tecidos durante vinte e quatro a quarenta e oito horas, com o objetivo do material recolhido ser preservado. Após este período, o material foi processado pela equipa técnica do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa. Durante este processamento, as zonas tumorais a analisar foram selecionadas macroscopicamente por um veterinário patologista, colocadas em cassetes próprias de acondicionamento e embebidas em parafina líquida, seguindo as normas da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) (Wolff et al., 2007).

##### **1.2. Seleção das Amostras**

De forma a se proceder à avaliação microscópica e seleção dos tumores malignos, foram efetuados cortes com 4µm de espessura, com o auxílio de um micrótomo. Estes cortes foram posteriormente corados com hematoxilina-eosina (HE), montados entre lâmina e lamela e classificados histologicamente por um veterinário patologista experiente. A classificação histológica adotada foi a de Golschmidt (2011) e o grau de malignidade foi atribuído de acordo com uma adaptação do sistema original de Elston e Ellis (1991).

Deste processo resultaram 53 amostras tumorais, cuja classificação histológica e grau de malignidade, quando aplicável, estão descritos na tabela 4. Foram também avaliadas 32 amostras de linfonodos retromamários.

Tabela 4. Tipo histológico, frequência absoluta e grau de malignidade dos 53 tumores da região mamária da população alvo de estudo.

Tipo histológico	Frequência absoluta	Grau de malignidade		
		I	II	III
A.M. simples de tipo tubular	2	N.A.		
A.M. simples de tipo papilífero-quístico	1			
A.M. complexo de tipo tubular	1			
C.M. simples de tipo tubular	4	1	1	2
C.M. simples de tipo túbulo-papilífero	3	1	2	
C.M. simples de tipo papilífero-quístico	15		15	
C.M. simples de tipo anaplásico	1			1
C.M. simples de tipo mucinoso	3		3	
C.M. complexo de tipo tubular	5	2	3	
C.M. complexo de tipo tubular quístico	1	1		
C.M. complexo de tipo túbulo-papilífero	3	1	2	
C.M. complexo de tipo papilífero-quístico	4		4	
C.M. complexo de tipo mucinoso quístico	3		3	
C.M. complexo sólido	1		1	
C.M. de células escamosas	1	1		
C.M. de tipo adenoescamoso	1			1
Hemangioma cavernoso	1	N.A.		
Hemangiossarcoma	1			
Lipoma	2			
Total	53	7	34	4

Legenda: A.M – adenoma mamário; C.M.- Carcinoma mamário; N.A. – Não aplicável.

A partir desta avaliação foram selecionados para a técnica de IHQ, vinte e um tumores mamários: sete carcinomas mamários simples de tipo papilífero-quístico, três carcinomas mamários simples de tipo túbulo-papilífero, três carcinomas mamários simples de tipo tubular, dois carcinomas mamários complexos de tipo tubular, um carcinoma mamário de tipo anaplásico, um carcinoma mamário de células escamosas, um carcinoma mamário simples de tipo mucinoso, um carcinoma mamário de tipo adenoescamoso, um carcinoma mamário complexo de tipo túbulo-papilífero e um carcinoma mamário complexo de tipo tubular quístico.

Das 22 cadelas inicialmente seguidas, uma delas não foi avaliada para o HER-2 através da técnica de imunohistoquímica, uma vez que a massa suspeita correspondia a um tumor mamário sarcomatoso, um hemangiossarcoma.

Foram ainda recolhidos vários dados clínicos que incluíram: idade, raça, género, estado reprodutivo, tipo de mastectomia, número e dimensão das lesões, presença de ulceração, aderência, necrose e calcificação.

## **2. Imunohistoquímica (IHQ)**

### **2.1. Seleção de Fragmentos para Análise**

Numa primeira fase foram selecionadas com recurso ao microscópio ótico, as áreas de cada tumor que iriam ser avaliadas por IHQ. Nesta seleção é importante evitar zonas quísticas, necrosadas, com reação inflamatória ou com diferenciação celular de forma a não comprometer os resultados. Depois de concluída a seleção microscópica, com o auxílio de um *punch* foram demarcadas as áreas nos blocos de parafina originais, tendo-se procedido ao corte dos mesmos, de forma a obter vários fragmentos das áreas previamente selecionadas. Estes fragmentos foram então aderidos a em lâminas de microscopia *Starfrost®* e desidratados numa estufa a 60°C, durante 60 minutos.

### **2.2. Protocolo de Imunohistoquímica**

Neste trabalho experimental foram realizados, no total, dez protocolos diferentes de IHQ. As variações testadas foram: no anticorpo primário utilizado e no método de recuperação antigénica. Os controlos utilizados foram os mesmos para todos os protocolos e consistiram em células SKBR3 (HER-2+) e num carcinoma mamário de mulher HER-2-negativo, para controlo positivo e negativo, respetivamente. Os reagentes necessários para a execução da técnica faziam parte do HercepTest® da DAKO, o escolhido para a realização dos protocolos experimentais.

Com o objetivo de tornar a leitura deste capítulo menos extensa e confusa, descreve-se, em seguida, os principais passos e diferenças dos protocolos de IHQ realizados:

- A técnica de IHQ teve início com a desparafinação e reidratação dos cortes, colocando-se, para isso, as lâminas em xilol, depois em tinas com concentração progressivamente menor de etanol (100%, 95% e 70%) e, por fim, em água destilada.
- Depois de reidratadas, procedeu-se à recuperação antigénica. Existem vários protocolos para a realização deste passo e, por isso, optámos pela realização de 4 protocolos diferentes:
  - a) Banho-Maria a 95°C durante 60 minutos, utilizando tampão citrato;
  - b) Panela de pressão a 2 atmosferas durante 2 minutos, utilizando tampão citrato;
  - c) Micro-ondas a 900W durante 5 minutos + 600W durante 15 minutos, utilizando tampão Tris-EDTA;
  - d) Digestão enzimática com proteinase K durante 10 minutos.

- O terceiro passo foi o bloqueio de proteínas; com o auxílio de uma caneta de tinta hidrofóbica (DAKO *Pen*®) foi delimitada a área envolvente do fragmento, onde, posteriormente, se colocou o Reagente de Bloqueio de Proteínas®, cobrindo a totalidade do fragmento. Seguiu-se o período de incubação com este reagente e lavagem com tampão apropriado (PBS).
- De seguida aplicou-se o anticorpo primário. Neste estudo foram utilizados quatro anticorpos diferentes: CB11, 4B5, SP3 e TAB250 (Tabela 5). Antes da sua aplicação, os anticorpos foram diluídos na solução *Antibody Diluent*® da DAKO. Depois de aplicados sobre o tecido, o anticorpo ficou a incubar “overnight”.
- Após o período de incubação com o anticorpo primário procedeu-se ao bloqueio da peroxidase com o Reagente de Bloqueio da Peroxidase®, da DAKO, durante 20 minutos.
- O sexto passo consistiu na incubação dos tecidos com o Reagente de Bloqueio do Pós-primário® da DAKO, durante 30 minutos.
- Posteriormente aplicou-se o anticorpo secundário. Neste estudo foi utilizado como anticorpo secundário, um polímero da Leica, denominado Novolink *Polimer*® que foi incubado durante 30 minutos.
- Para sinalizar a deteção de HER-2 aplicou-se sobre as amostras um cromogénico, a 3,3'-Diaminobenzidina (DAB, *DAB Chromogen*® – Novocasta Leica). Depois deste passo, coraram-se os tecidos com hematoxilina.
- Por fim, os tecidos foram desidratados, emergindo as lâminas em tinas com concentrações crescentes de etanol (procedimento inverso ao primeiro passo) e, posteriormente, em xilol. Depois foi colocada uma gota de meio de montagem (Entellan®) nas lamelas que são posteriormente montadas sobre as lâminas.

Tabela 5. Caracterização dos vários anticorpos primários utilizados.

Anticorpo primário						Recuperação antigénica
Clone	Tipo	Antigénio	Origem	Diluição	Tempo de incubação	
4B5	Monoclonal de coelho	Domínio intracelular	Ventana®;	“RTU”	Overnight	
CB11	Monoclonal de rato	Domínio intracelular	Invitrogen®	“RTU”	Overnight	
SP3	Monoclonal de coelho	Domínio extracelular	Zytomed®;	1:100	Overnight	
TAB250	Monoclonal de rato	Domínio extracelular	Zymed®;	1:50	Overnight	Proteinase K, 10'

Legenda: “RTU” – *ready to use*.

### 2.3. Avaliação da Imunohistoquímica

As lâminas foram analisadas e classificadas semi-quantitativamente por dois veterinários patologistas, sem cruzamento de dados durante o processo, e a imunorreatividade do HER-2 foi avaliada segundo as novas diretrizes da ASCO (Wolff et al., 2007). Segundo estas, os tumores sem marcação na membrana citoplasmática são classificados com 0; os tumores com marcação fraca e incompleta da membrana citoplasmática são 1+; os tumores com marcação completa da membrana citoplasmática, de fraca intensidade e não uniforme, em pelo menos 30% das células, são 2+; e por fim, os tumores com marcação completa da membrana citoplasmática, uniforme e intensa, em pelo menos 30% das células tumorais, são classificados como 3+. Desta forma, foram classificados como negativos para HER-2 os tumores classificados de 0 e 1+, e positivos, os tumores classificados como 2+ e 3+.

Tabela 6. Resumo dos critérios de interpretação da IHQ.

0	Sem marcação de membrana
1+	Marcação fraca e incompleta da membrana, <10% das células
2+	Marcação completa não-uniforme e/ou fraca em pelo menos 10% das células ou marcação completa intensa em <30% das células
3+	Marcação completa intensa da membrana,> 30% das células

### 2.4. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o apoio dos programas Microsoft Office Excel® 2013 e IBM SPSS Statistics® 20. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Foi realizado o teste de  $\chi^2$  para analisar a associação entre a sobreexpressão de HER-2 e vários parâmetros. Para todas as análises, o valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo. Para a avaliação da idade os animais foram divididos em 2 classes: idade inferior a 9 anos e superior ou igual a 9 anos.

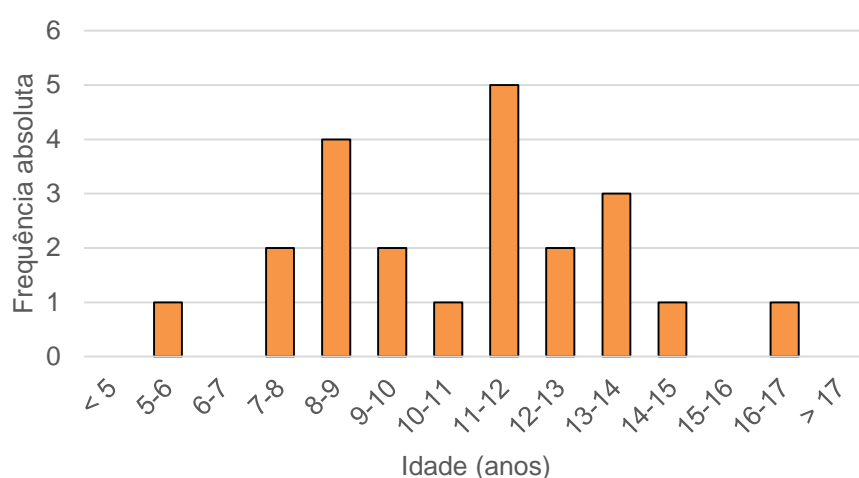
## IV. Resultados

### 1. Caracterização da Amostra Populacional

#### 1.1. Distribuição etária e rática das cadelas portadoras de tumores mamários

Neste estudo, a idade média das cadelas selecionadas foi de  $10,2 \pm 2,7$  anos. A cadela mais jovem apresentava a idade de 5 anos e 9 meses e a cadela mais velha tinha 16 anos e 8 meses. Os picos de incidência dos tumores mamários foram os 8-9 anos (18,16%) e os 11-12 anos (22,7%), como se pode observar no gráfico 1.

Gráfico 1. Distribuição etária das cadelas com tumores mamários.



Apesar da frequência absoluta ser, na maioria das raças, de apenas um caso, houve um vasto leque afetado, nomeadamente: Boxer, Caniche, Dogue Alemão, Golden Retriever, Labrador, Pastor Alemão, Rottweiler, Serra da Estrela, Fox Terrier e Yorkshire Terrier. Houve dois casos na raça Shi-Tzu e dez casos (45% da amostra) em cadelas de raça indeterminada.

#### 1.2. Caracterização e distribuição dos tumores mamários

O número médio de tumores mamários detetados e excisados foi de  $2,45 \pm 1,45$  (com uma variação entre 1 e 7). A moda foi de 1 tumor e a percentagem de cadelas em que esta situação ocorreu foi de 31,9%. Em relação à raça, curiosamente o número mais elevado de tumores ( $n=7$ ) foi registado numa cadela de raça indeterminada, seguindo-se a raça Labrador e Pastor Alemão ( $n=4$ ). No gráfico 2 está representada a distribuição da quantidade de tumores em relação à raça. É apresentado na tabela 7 o número de tumores totais e o número de cadelas afetadas. Verifica-se que estes parâmetros são inversamente

proporcionais, sendo mais frequente existir só 1 tumor por cadela e, à medida que o número de tumores aumenta, a probabilidade de isto afetar mais de 1 cadela diminui.

Gráfico 2. Frequência absoluta do número de tumores excisados tendo em conta a raça.

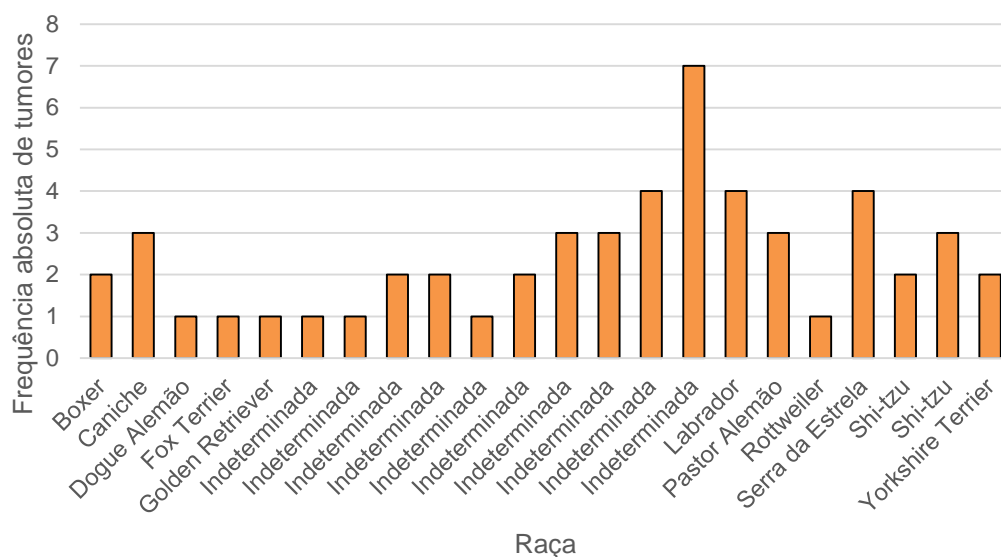


Tabela 7. Número de tumores identificados por cadela e número de cadelas afetadas por esse número.

Nº total de tumores	Nº de cadelas afetadas
1	7
2	6
3	4
4	4
7	1

Em termos de dimensão, o eixo-maior/diâmetro médio dos tumores foi de  $3,25 \pm 2,8$  cm (com uma variação de 0,5 a 12 cm). Na figura 8 pode-se verificar a dimensão que alguns tumores mamários podem atingir e o número elevado de nódulos presentes. Neste caso foram detetados 7 carcinomas, dos quais o maior apresentava 12 cm de diâmetro. Mais dados sobre a dimensão dos tumores são apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Média, Desvio Padrão e diâmetro máximo registado nos tumores benignos e nos tumores malignos.

	Média do diâmetro $\pm$ Desvio Padrão (cm)	Diâmetro máximo registado (cm)
Tumores benignos	$3,35 \pm 1,83$	6
Tumores malignos	$3 \pm 2,92$	12





Figura 8. Material resultante da Mastectomia Bilateral de uma das cadelas incluídas no estudo.

Em relação à distribuição das neoplasias pelas glândulas mamárias, as localizações mais frequentes foram, respetivamente, em E3 (mama abdominal cranial esquerda), E5 (mama inguinal esquerda) e E2 (mama torácica caudal esquerda), como se pode verificar pelo gráfico 3. Na cadeia mamária direita, a localização mais frequente foi em D2 (mama torácica caudal direita) e D4 (mama abdominal caudal direita). Na figura 9 pode-se verificar a presença de um nódulo em cada cadeia mamária de uma das cadelas acompanhadas que, após análise histopatológica, foram classificados como um carcinoma mamário simples de tipo papilífero-quístico e um carcinoma complexo de tipo tubular quístico

Gráfico 3. Distribuição dos tumores mamários pelas glândulas mamárias.

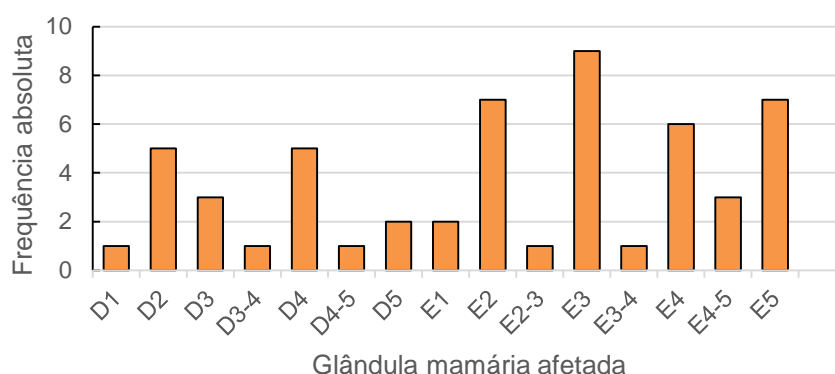




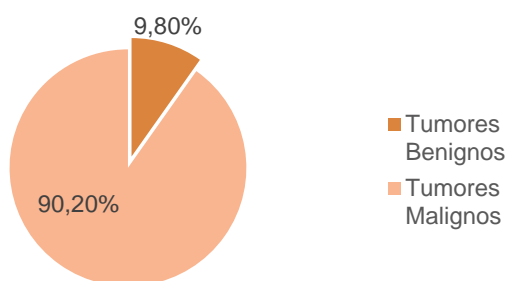
Figura 9. Localização dos nódulos mamários numa das cadelas incluídas no estudo.

A presença de ulceração foi referida num único caso, numa cadela de raça Serra da Estrela, sendo que esta se apresentava cicatrizada na altura da cirurgia. Foi encontrada calcificação em 5 casos (22,73%) e necrose em 13 casos (59,1%).

### 1.3. Frequência e distribuição dos tumores mamários benignos e malignos

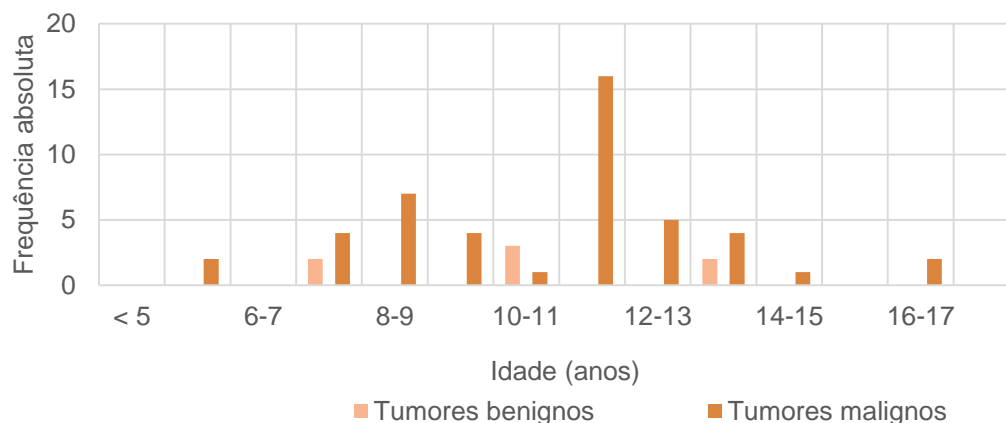
O número de tumores mamários recolhidos fez um total de 51. Após avaliação histológica determinou-se que a quantidade de tumores benignos e malignos foi de 5 e 46, respetivamente (Gráfico 4). Houve ainda a ocorrência de dois lipomas, excluídos por não serem neoplasias mamárias. Se tivermos em conta apenas as cadelas de raça indeterminada que representam 45,5% do total da amostra, a frequência relativa dos tumores malignos foi de 100%. Nas cadelas de raça definida houve a presença de 5 benignos e 36 malignos (87,8%).

Gráfico 4. Frequência relativa dos tumores benignos e dos malignos.



Em geral, os tumores mamários afetaram predominantemente cadelas de meia-idade ou velhas. A idade onde se registaram mais casos de tumores benignos e de malignos foi aos 10 anos e 11 anos, respetivamente (Gráfico 5).

Gráfico 5. Distribuição dos tumores benignos e malignos em relação à idade das cadelas.



Relativamente à presença de metastização regional, dos 32 linfonodos retromamários analisados, 3 foram positivos (9,37%). Dois eram linfonodos retromamários esquerdos e um direito. Os tumores que deram origem a esta metastização foram: um carcinoma mamário simples de tipo túbulo-papilífero de grau II de malignidade, um carcinoma mamário de tipo adenoscamoso de grau III de malignidade e um carcinoma mamário simples de tipo tubular de grau III de malignidade (Figura 10).

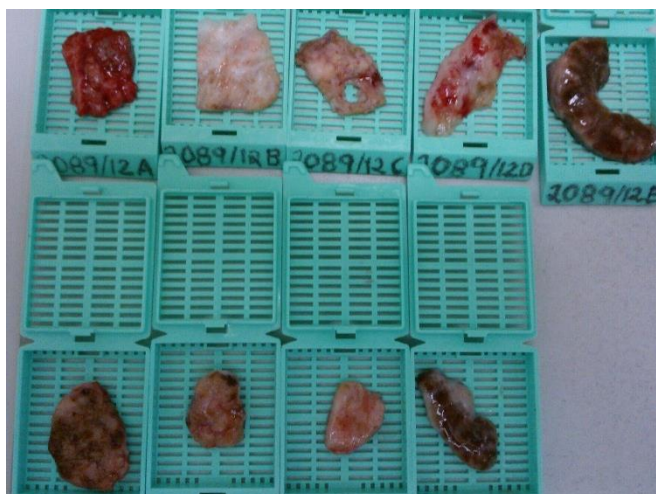
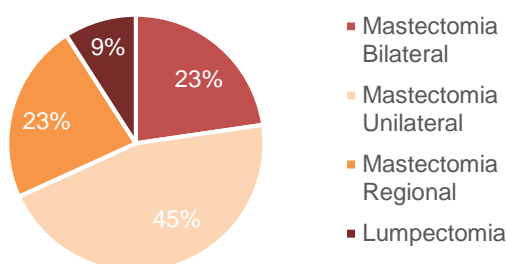


Figura 10. Variedade do aspeto macroscópico dos tumores mamários presentes na mesma cadela e linfonodos retromamários. Após a análise histopatológica destas massas foram diagnosticados 4 carcinomas mamários simples do tipo papilífero quístico, 2 carcinomas mamários complexos do tipo papilífero quístico e 1 carcinoma sólido, todos com características microscópicas únicas. Os linfonodos estão nas cassetes mais à direita em ambas as linhas.

#### 1.4. Comparação dos métodos cirúrgicos

Todas as cadelas eram inteiras na altura da cirurgia. Foi realizada mastectomia bilateral em 5 casos (22,7%), mastectomia unilateral em 10 casos (45,5%), mastectomia regional em 5 casos (22,7%) e lumpectomia em 2 casos (9%). Associada à mastectomia, a ovariectomia foi realizada em 3 casos (13,6%), sendo que todas as cadelas submetidas a esta cirurgia eram de raça indeterminada.

Gráfico 6. Frequência relativa dos diferentes procedimentos cirúrgicos



## 2. Perfil Imunohistoquímico dos Tumores Mamários Caninos

### 2.1. Imunoreatividade do anticorpo CB11

Neste estudo, foi detetada uma sobreexpressão de HER-2 em vários tumores quando utilizado o anticorpo primário CB11. Esta deteção ocorreu nos três protocolos realizados, obtendo-se os melhores resultados com a utilização da Panela de Pressão na fase de recuperação antigénica. A sobreexpressão de HER-2 detetada obteve uma positividade média de 40,5%. Os resultados 3+ foram registados em duas cadelas: uma Rottweiler com 8,9 anos de idade e que apresentava um carcinoma mamário simples de tipo túbulo-papilífero, de grau II de malignidade, que obteve classificação 3+ nos três protocolos; e uma Caniche com 9,9 anos, com um carcinoma mamário complexo de tipo tubular, de grau I de malignidade, através do método da Panela de Pressão. No gráfico 7 apresenta-se a classificação para os vários tumores após IHQ com o anticorpo CB11 e perante 3 métodos diferentes de recuperação antigénica. Após análise estatística verificou-se que não houve associação estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre o tipo de recuperação antigénica com o CB11 e os resultados de HER2. Nas figuras 11-14 pode se observar diferentes scores obtidos após avaliação do *status* de HER-2, utilizando o anticorpo CB11 e, como método de recuperação antigénica, a Panela de Pressão.

Gráfico 7. Classificação do *status* HER-2 após IHQ dos tumores mamários utilizando o anticorpo CB11

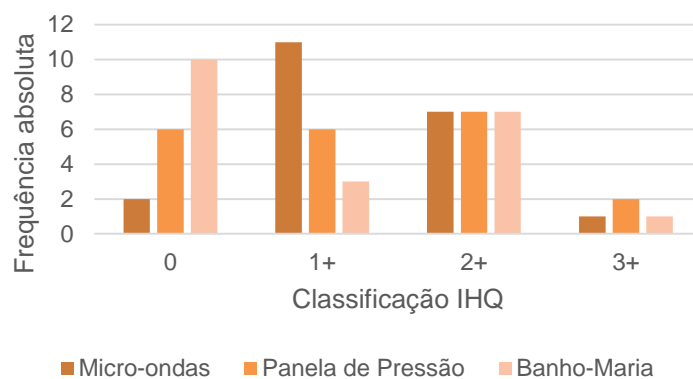


Tabela 9. Distribuição dos tumores HER-2-positivos utilizando o anticorpo CB11 relativamente aos diferentes métodos de recuperação antigénica

Recuperação Antigénica	Tumores HER-2+ (2+ e 3+)	
Micro-ondas	8	38,1%
Panela de Pressão	9	42,85%
Banho-Maria	8	38,1%

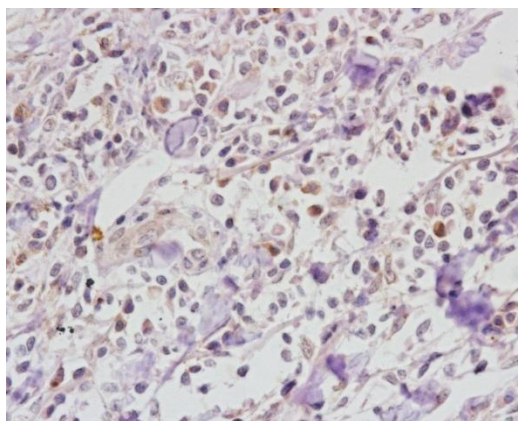


Figura 11. Avaliação do *status* de HER-2 num tumor mamário canino através da técnica de IHQ, utilizando o anticorpo CB11 e como método de recuperação antigénica a Panela de Pressão. Carcinoma adenoscamoso classificado como 0 (400x).



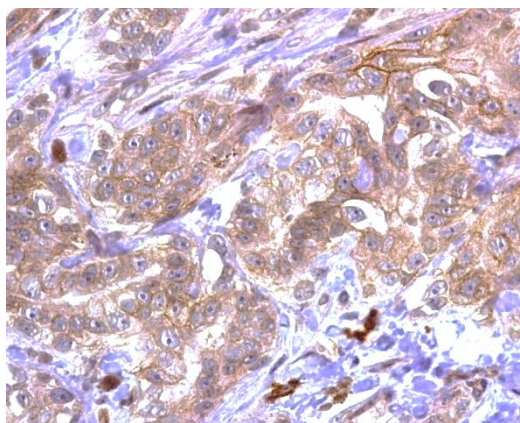


Figura 12. Avaliação do *status* de HER-2 num tumor mamário canino através da técnica de IHQ, utilizando o anticorpo CB11 e como método de recuperação antigénica a Panela de Pressão. Carcinoma simples tubular classificado como 1+ (400x).

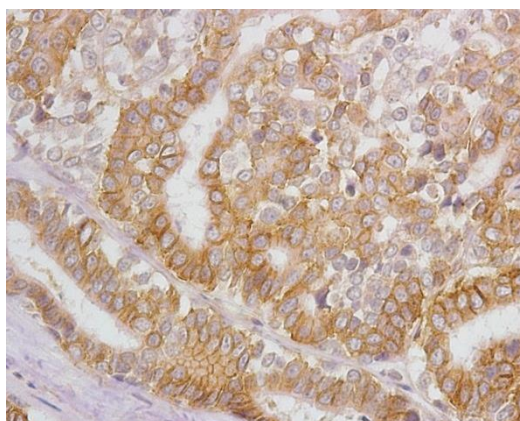


Figura 13. Avaliação do *status* de HER-2 num tumor mamário canino através da técnica de IHQ, utilizando o anticorpo CB11 e como método de recuperação antigénica a Panela de Pressão. Carcinoma complexo túbulo-papilífero classificado como 2+ (400x).

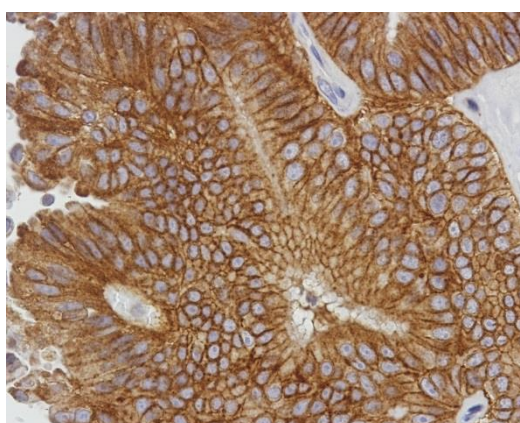


Figura 14. Avaliação do *status* de HER-2 num tumor mamário canino através da técnica de IHQ, utilizando o anticorpo CB11 e como método de recuperação antigénica a Panela de Pressão. Carcinoma simples túbulo-papilífero classificado como 3+ (400x).

## 2.2. Imunoreatividade do anticorpo 4B5

Foi detetada igualmente a sobreexpressão de HER-2 quando foi utilizado o anticorpo primário 4B5, após o método do Micro-ondas ou da Panela de Pressão terem sido usados na recuperação antigénica. A sobreexpressão de HER-2 foi detetada em 19% dos tumores analisados com este anticorpo. Os resultados 3+ foram observados em 2 cadelas: uma Rottweiler com 8,9 anos de idade, portadora de um carcinoma mamário simples de tipo túbulo-papilífero, de grau II de malignidade; e numa Caniche, 9,9 anos, com carcinoma mamário complexo de tipo tubular, de grau 1 de malignidade. Ambos os resultados 3+ foram observados, exclusivamente, após o uso da Panela de Pressão (Tabela 10). No gráfico 8 apresenta-se a classificação do *status* de HER-2 proteico obtido após IHQ com o anticorpo 4B5 e os 3 diferentes métodos de recuperação antigénica. O tipo de recuperação antigénica está associado com a deteção da sobreexpressão de HER-2 ( $p < 0,05$ ), sendo que a utilização do método de recuperação com panela de pressão foi associado a maior número de casos com sobreexpressão proteica.

Gráfico 8. Classificação do *status* HER-2 após IHQ dos tumores mamários utilizando o anticorpo 4B5.

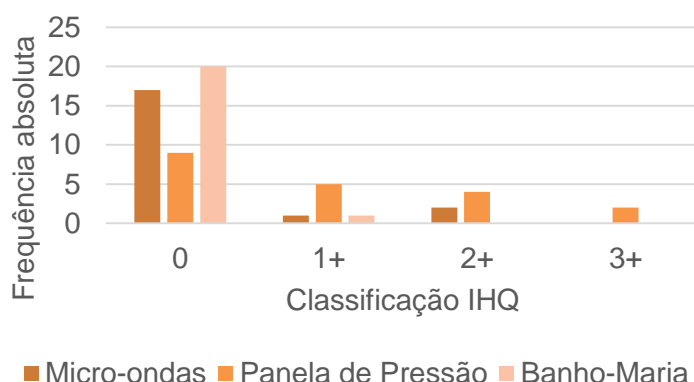


Tabela 10. Distribuição dos tumores HER-2-positivos utilizando o anticorpo 4B5 relativamente aos diferentes métodos de recuperação antigénica.

Recuperação Antigénica	Tumores HER-2-positivos (2+ e 3+)	
Micro-ondas	2	9,52%
Panela de Pressão	6	28,57%
Banho-Maria	0	0%

### 2.3. Imunoreatividade do anticorpo SP3

Com o anticorpo SP3 foi apenas registado 1 caso positivo (2+), que correspondia a um carcinoma mamário complexo de tipo tubular, de grau I de malignidade, quando o método do Micro-ondas foi utilizado como método de recuperação antigénica. No gráfico 9 apresenta-se a classificação do *status* de HER-2 obtida após IHQ com o anticorpo SP3 e 3 diferentes métodos de recuperação antigénica. A análise estatística não demonstrou diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre o método de recuperação antigénica e os resultados de imunomarcação para HER2. Na figura 15 pode observar-se a imunomarcação com diferentes anticorpos (SP3 e CB11) para o mesmo tumor, após tratamento com Panela de Pressão.

Gráfico 9. Classificação do *status* HER-2 após IHQ dos tumores mamários utilizando o anticorpo SP3

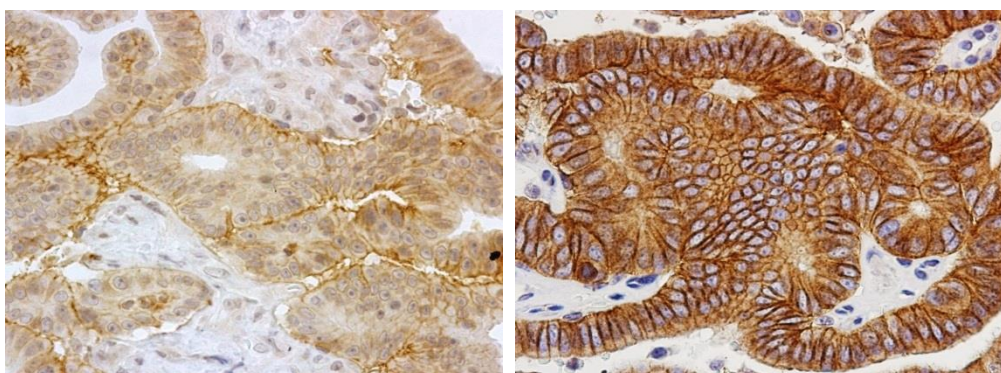
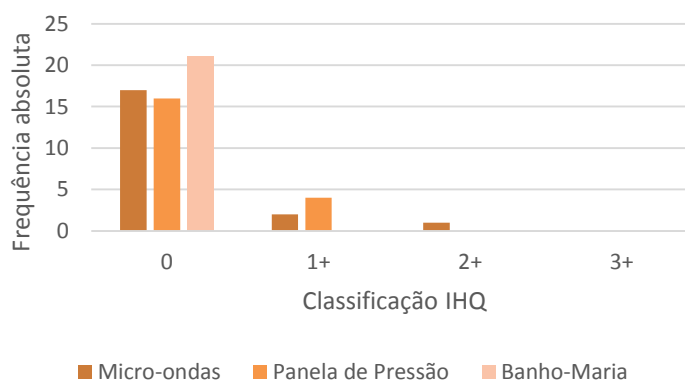


Figura 15. Comparação das intensidades de marcação obtidas após a utilização dos anticorpos SP3 e CB11, após tratamento com Panela de Pressão. Carcinoma simples túbulo-papilífero classificado como 1+ com o anticorpo SP3 (imagem esquerda) e como 3+ com o anticorpo CB11 (imagem direita) (400x).

### 2.4. Imunoreatividade do anticorpo TAB250

Este anticorpo não apresentou qualquer marcação nos 21 tumores mamários analisados neste estudo; todos os tumores foram classificados com 0.



Em suma, após os 10 protocolos executados constatou-se que ocorreu imunoreatividade quando foram utilizados os anticorpos primários CB11 e 4B5 e SP3. Os resultados mais consistentes foram obtidos com o anticorpo CB11, com 40,5% dos carcinomas a mostrarem sobreexpressão de HER-2. De destacar também que os tumores que obtiveram a classificação 3+ com o anticorpo CB11 e o 4B5 pertenciam às mesmas duas cadelas.

## 2.5. Relação entre os Tumores HER-2+ e os Parâmetros Clínicos e Histopatológicos

### 2.5.1. Idade

A idade das cadelas com TMC HER-2+ variou entre os 8 e os 16 anos e a média entre os 8,5 e os 9,8 anos, consoante o protocolo de IHQ utilizado. A idade onde se registou mais frequentemente um maior número de casos positivos foi aos 8 anos. Após análise estatística de todos os protocolos utilizados verificou-se que, à exceção do protocolo CB11 + Banho-Maria, nenhum protocolo apresentou valores estatisticamente significativos para a associação entre a idade e o nível de HER-2 nos tecidos. No caso do protocolo CB11 + Banho-Maria verificou-se que a sobreexpressão do HER-2 (detetada por IHQ) foi associada a cadelas com menos de 9 anos de idade (Anexo III – Tabelas 17-22)

Tabela 11. Caracterização etária das cadelas com TMC HER-2+

Protocolos IHQ	Nº Tumores HER-2+	Caraterização etária das cadelas com TMC HER-2+ (anos)						
		Mínimo	Máximo	Média	Moda	Mediana	Desvio padrão	IC (95%)
CB11 + Mw	8	8	13	9,6	8	8,5	2,066	8,2-11,1
CB11 + PP	9	7	16	9,8	(7,8,9)	9	3,032	7,8-11,8
CB11 + BM	8	7	16	9,3	8	8	3,012	7,2-11,3
4B5 + Mw	2	8	9	8,5	(8,9)	8,5	0,707	7,5-9,5
4B5 + PP	6	7	16	9,2	(7,8)	8	3,430	6,4-11,9
SP3 + Mw	1	9	9	9	9	9	N.A	N.A

### 2.5.2. Localização do tumor

A localização mais frequente dos TMC HER-2+ foi a região abdominal (3º e 4º par de glândulas). Não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ) em relação à localização do tumor mamário, quer em termos de aparecimento na cadeia mamária esquerda ou direita bem como em relação à glândula afetada.

### 2.5.3. Tipo Histopatológico e Grau de Malignidade

A amostra submetida a avaliação dos níveis de expressão por IHQ totalizou 21 tumores, que se dividiam em 10 tipos de carcinomas diferentes. O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma mamário do tipo papilífero-quístico (33,3%). Em todos os protocolos onde houve sobreexpressão de HER-2, os tumores simples surgiram sempre em maior número do que os tumores complexos. O grau de malignidade mais frequente foi o grau II com n=11 (52,4%). Adicionalmente, a análise estatística não demonstrou associação estatisticamente significativa entre o tipo histológico do tumor ou o grau de malignidade e os níveis de HER2 teciduais (Anexo III – Tabelas 29-39). A caracterização histopatológica dos tumores analisados é apresentada na tabela 12.

Tabela 12. Caracterização histopatológica dos tumores analisados pela técnica de IHQ.

Tumores analisados	F. A.	Grau de malignidade			Diferenciação mesenquimatos a benigna	
		I	II	III	Sim	Não
C.M. simples de tipo túbulo-papilífero	3	1	2		1	2
C.M. complexo de tipo tubular	2	1	1		1	1
C.M. simples de tipo tubular	3	1		2	2	1
C.M. simples de tipo papilífero quístico	7		7		2	5
C.M. simples de tipo anaplásico	1			1	0	1
C.M. de células escamosas	1	1			0	1
C.M. simples de tipo mucinoso	1		1		0	1
C.M. de tipo adenoescamoso	1			1	0	1
C.M. complexo de tipo túbulo-papilífero	1	1			1	0
C.M. complexo de tipo tubular quístico	1	1			0	1
Total	21	6	11	4		

Legenda: F.A. – Frequência absoluta.

### 2.5.4. Diferenciação Mesenquimatosa Benigna

Os tumores que não possuíam diferenciação mesenquimatosa benigna mostraram uma maior frequência de sobreexpressão de HER-2 nos vários protocolos de IHQ realizados. Após a execução do teste do  $\chi^2$ , foi determinado um valor de  $p \geq 0,05$  em 4 dos 6 protocolos com TMC HER-2+. Nos protocolos CB11 + Panela de Pressão e 4B5 + Panela de pressão, o valor encontrado para p é inferior a 0,05, pelo que, quando submetidos a estes dois protocolos, a sobreexpressão de HER-2 encontra-se associada a tumores sem diferenciação mesenquimatosa benigna (Anexo III – Tabelas 40-45).

## V. Discussão

Com o objetivo de se compreender melhor o panorama epidemiológico dos tumores mamários caninos, e em maior destaque os HER-2+, foram recolhidos vários dados clínicos e histopatológicos sobre cada animal incluído no estudo. A população foi composta por 21 fêmeas com idades variando entre os 5 anos e 9 meses e os 16 anos e 8 meses (idade média  $10,2 \pm 2,7$  anos). A existência de apenas fêmeas afetadas por tumores mamários é concordante com a literatura consultada, uma vez que, nos machos, a taxa de ocorrência é, em média, inferior a 1% (Dorn, 1968; Bears, Schulman & Carter, 2012). Esta neoplasia costuma ser rara em cadelas com idade inferior a 5 anos (Dorn, 1968; Schneider, 1970; Sorenmo et al., 2009) e a idade de maior suscetibilidade situa-se entre os 9 e os 11 anos (Peleteiro, 1994), dados concordantes com os nossos resultados. Os tumores benignos ocorreram com maior frequência aos 10 anos e os malignos aos 11 anos, o que se revela semelhante ao encontrado por outros autores, onde estes picos de incidência se situavam aos 7-9 anos e 9-11 anos para benignos e malignos, respetivamente (Benjamin et al., 1999; Sorenmo et al., 2009).

Das raças afetadas neste estudo, aquelas em que já tinha sido descrita uma maior incidência de tumores mamários foram a Boxer, Caniche, Pastor Alemão e Yorkshire Terrier (Dorn, 1968; Yamagami et al., 1996b; Moe, 2001; Egenvall et al., 2005; Costa, 2011). Os tumores benignos foram apenas registados em duas cadelas de raça indeterminada e uma Labrador, significando que as restantes cadelas das 10 raças presentes no estudo, só possuíam tumores mamários malignos. Estes dados sugerem uma maior tendência para a presença de tumores mamários malignos nas cadelas de raça definida, algo já antes descrito por Vascellari et al. (2009).

Esta neoplasia pode manifestar-se pela presença de um ou vários nódulos (Misdorp, 2002) sendo que 70% das cadelas inteiras podem apresentar mais de um tumor na altura do diagnóstico (Sorenmo et al., 2009). No nosso estudo a percentagem de cadelas com mais de um tumor foi de 66,6%, sendo todas inteiras. Os tumores mamários podem surgir em qualquer glândula mamária mas está descrita uma maior incidência nas glândulas mamárias abdominais e inguinais (Brodey, Goldschmidt & Roszel, 1983; Ežerskyte et al., 2011; Sorenmo et al., 2013), o que suporta os dados encontrados neste estudo, onde a maior percentagem de tumores ocorreu nas glândulas mamárias abdominais e inguinais. Dos 51 tumores mamários recolhidos, 90,2% eram tumores malignos. Esta percentagem é muito superior à descrita por Moe (2001) e Merlo et al. (2008) (50% e 70%, respetivamente), e pode dever-se à pequena dimensão da amostra. Poderá ainda estar relacionada com a não excisão cirúrgica dos nódulos de diâmetro muito reduzido, ou por não ter havido o envio dos

mesmos para análise histopatológica, tudo fatores descritos na literatura (Misdorp, 2002, Peleteiro, 1994) mas que não deverão ter ocorrido neste estudo, uma vez que todos os nódulos detetados foram excisados e analisados. Houve três casos de metastização nos linfonodos regionais, isto é, em 6,5% (3/46) dos carcinomas identificados, o que fica aquém dos 30% descritos na literatura (Sorensen, 2003), facto que se poderá justificar pela dimensão da amostra e diferença da composição de tipos histológicos tumorais entre os dois estudos.

Após a determinação da sobreexpressão de HER-2, foi investigada a sua relação com vários parâmetros como a idade, a localização tumoral, o tipo histológico (incluindo o facto do tumor ser simples/complexo), grau de malignidade e o método de recuperação antigénica. Verificou-se que a sobreexpressão de HER-2, nesta amostra, não foi estatisticamente associado à localização, tipo histológico, grau de malignidade e se o tumor é simples ou complexo. Martín de las Mulas (2003) relacionou os tumores HER-2+ com a presença de um diâmetro maior, grau de malignidade III e tipo histológico simples, indicadores de um pior prognóstico (Yamagami et al., 1996b; Misdorp, et al 1999; Pérez-Alenza et al., 2000; Philibert et al., 2003). No entanto Gama et al (2008) não encontrou associação entre este tipo de tumores e estes parâmetros. Dutra et al., (2004) observou uma associação entre a sobreexpressão de HER-2+ e o grau de malignidade.

Com o protocolo CB11+ Banho-Maria houve associação entre a idade e a sobreexpressão de HER-2, sendo que, neste caso, os tumores HER-2+ estão associados a cadelas com idade inferior a 9 anos. Há que realçar que, apesar de não ter sido encontrada associação estatisticamente significativa entre o protocolo CB11+ Panela de Pressão e a idade, os casos positivos deste protocolo afetavam maioritariamente cadelas com idade superior a 9 anos. Isto poderá significar que terá de se ter alguma precaução com as conclusões a tirar sobre a relação entre os tumores HER-2+ e a idade das cadelas.

Finalmente, considerando o parâmetro “diferenciação mesenquimatosa benigna”, dos seis protocolos que identificaram sobreexpressão de HER-2, dois deles obtiveram um valor de  $p < 0,05$  no teste do  $\chi^2$ . Os protocolos que mostraram essa associação foram: CB11+ Panela de Pressão e 4B5 + Panela de Pressão, e, em ambos, a sobreexpressão de HER-2 estava associada ao facto de ser tumor sem diferenciação mesenquimatosa benigna. Por outro lado, Hsu et al. (2009) associou os tumores mamários malignos HER-2-positivos com um aumento da sobrevivência das cadelas, um ano após a mastectomia, e considerou a sobreexpressão deste recetor como um fator de bom prognóstico. Em comparação, na Mulher, os tumores HER-2 estão associados a características de maior agressividade e

malignidade (grau de malignidade elevado, tipo histológico simples, metastização elevada) o que determina um pior prognóstico (Wolff, 2007).

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a presença de reatividade cruzada entre os anticorpos utilizados para avaliar a expressão de HER-2 na Mulher e os tumores mamários caninos. A sobreexpressão de HER-2 ocorreu entre 19% e 40,5% dos tumores, dependendo do anticorpo primário utilizado. Estes valores situam-se no intervalo encontrado nos vários estudos que avaliavam a sobreexpressão do HER-2 em tumores mamários malignos caninos: 17% (Martín de las Mulas, 2003), 29,7% (Hsu et al., 2009), 35,4% (Dutra et al., 2004); 35,3% (Kim et al., 2011), e 40% (Singer et al., 2012). A sobreexpressão obtida é, também, semelhante à descrita na literatura sobre os tumores mamários da Mulher, onde 20 a 30% dos tumores sobreexpressam HER-2 (Press et al., 2002; Wolff et al., 2007). Apesar das percentagens obtidas neste estudo serem concordantes com os estudos anteriores, as diferenças verificadas entre os vários estudos resultam, muito provavelmente, dos diferentes protocolos utilizados (anticorpos utilizados, diferentes diluições, diferentes métodos de recuperação, diferenças no processamento da amostra e adoção de critérios de classificação da sobreexpressão diferentes), fatores epidemiológicos e dimensão da amostra. Para além disto, a avaliação da sobreexpressão com base na IHQ pode ser influenciada por artefactos técnicos e variabilidade na interpretação entre os observadores (Press, Hung, Godolphin & Slamon, 1994).

Gama et al. (2008) observou uma sobreexpressão de HER-2 de 8,3% em tumores mamários caninos em oposição aos 38,1% encontrados neste estudo, tendo sido utilizado, aparentemente, o mesmo anticorpo e o mesmo método de recuperação antigénica (CB11 + Micro-ondas). As principais diferenças entre os dois estudos foram: o nosso estudo seguiu as normas de processamento recomendadas pela ASCO e foram colhidos diretamente das cirurgias, ao passo que os tumores do estudo de Gama et al. (2008) foram selecionados a partir de uma base de dados de material histopatológico, podendo isto ter influenciado o estado de conservação das amostras; os reagentes utilizados durante toda a IHQ foram diferentes nos dois estudos; enquanto no estudo de 2008, a avaliação do *status* de HER-2 baseou-se na grelha de classificação HercepTest mais antiga (0 = sem marcação ou <10% das células, 1+ = membrana incompleta em > 10% das células, 2+ = marcação completa fraca a moderada em mais de 10% das células, e 3+ = marcação da membrana completa e forte em > 10% células), o estudo aqui apresentado utilizou a nova classificação da ASCO. Estes fatores, aliado às variações individuais na avaliação da IHQ, poderão ter contribuído para a diferença de resultados obtidos nos dois estudos.

Após a análise mais aprofundada dos resultados obtidos no nosso estudo, constata-se que a imunodeteção de HER-2 só foi possível com os anticorpos primários CB11 e 4B5, cujos epítomos se encontram no domínio intracelular do recetor HER-2. Os anticorpos SP3 e TAB250 não mostraram resultados positivos (existe uma exceção no SP3, discutida adiante). O facto de terem sido apenas os anticorpos que reconhecem o domínio intracelular a detetar o HER-2 pode ter sido devido a vários fatores como: a não total preservação do domínio extracelular pelo formol; a não conservação dos epítomos do HER-2 na cadela, apesar da homologia entre os recetor HER-2 humano e canino ser de 92% (Singer et al., 2012); ou, ainda, devido à não tradução do domínio extracelular, isto é, à existência da proteína p95HER-2. Para que este argumento fosse o único responsável, teria de haver uma mutação genética em 100% dos carcinomas caninos estudados, excluindo o único caso positivo com o anticorpo SP3, o que torna este facto pouco plausível. Na Mulher, esta proteína mutada está presente em cerca de 23% dos tumores mamários malignos (Christianson, 1998; Scaltriti et al., 2007) e na cadela, até à data, não existem estudos sobre esta proteína.

Relativamente ao caso excepcional de positividade com o SP3, anticorpo que deteta o domínio extracelular, propõe-se em seguida um leque de hipóteses para explicar este resultado. O facto de este tumor ter demonstrado uma elevada sobreexpressão de HER-2 com os anticorpos CB11 e 4B5, leva a inferir que possui uma elevada quantidade de recetores HER-2. Este facto poderá aumentar a probabilidade de existir uma maior quantidade de domínios extracelulares conservados após a fixação. Esta hipótese é, no entanto, pouco provável uma vez que houve outros casos com sobreexpressão de HER-2 com o CB11 e 4B5, mas com resultados negativos para o SP3. O facto de a sobreexpressão ter sido classificada como 2+ torna, igualmente, a positividade do tumor questionável, já que os casos 2+ são confirmados por FISH ou CISH na Mulher, uma vez que apenas cerca de 24% destes revela amplificação do gene HER-2 (Wolff et al., 2007). Outra razão que torna esta positividade questionável é o facto de esta cadela só ter mostrado sobreexpressão quando o antigénio foi recuperado pelo protocolo do Micro-ondas, sabendo-se que, neste estudo, este método de recuperação antigénica não está estatisticamente correlacionado com a sobreexpressão de HER-2 (pelo menos quando utilizado este anticorpo primário). Na literatura, o anticorpo SP3 é pouco usado e tem mostrado baixas percentagens de carcinomas com sobreexpressão de HER-2 (3,7% e 13,7%), na Mulher (Ricardo, Milanezi, Carvalho, Aguilera & Schmitt, 2007). Também, na Mulher, este anticorpo apresenta uma sensibilidade e especificidade superior a 95% (Nunes, et al., 2013), e a concordância entre a sobreexpressão detetada e a FISH é de 89%, ou 97,6% se forem excluídos os casos 2+ (D'Alfonso et al., 2013). Todos estes estudos apontam o SP3 como um anticorpo relativamente fiável na determinação da sobreexpressão de HER-2 nos tumores mamários da

Mulher. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo sobre o uso de SP3 na cadela. Os resultados do presente estudo questionam a sua utilização nos TMC, mas mais estudos sobre este anticorpo são recomendados.

Foram realizados para os anticorpos CB11, 4B5 e SP3, três protocolos diferentes de recuperação antigénica de forma a compreender melhor como estes poderão afetar a deteção da sobreexpressão de HER-2. Obtiveram-se mais resultados positivos quando foi utilizado a Panela de Pressão. O uso de Micro-ondas foi o segundo método com percentagem mais elevada de positivos e o Banho-Maria apenas obteve resultados positivos com o anticorpo CB11. Foi realizado um teste de independência de duas variáveis qualitativas (Teste do  $\chi^2$ ) para verificar a associação entre o protocolo utilizado e os valores de sobreexpressão de HER-2. Dos resultados obtidos pôde-se concluir que, para os anticorpos CB11 e SP3, a sobreexpressão de HER-2 é independente do protocolo utilizado e não houve diferença estatisticamente significativa entre estes. No caso do anticorpo 4B5 foi verificada uma correlação positiva entre a sobreexpressão de HER-2 e o protocolo utilizado, tendo o método da Panela de Pressão mostrado melhores resultados.

## VI. Conclusão

Este trabalho experimental permitiu confirmar a existência de sobreexpressão de HER-2 nos tumores mamários malignos da cadela. Apenas os anticorpos que reconhecem o domínio intracelular detetaram o recetor HER-2 nos tecidos neoplásicos de mama de cadela. A percentagem de sobreexpressão foi de 19% para o anticorpo 4B5 e de 40,5% para o anticorpo CB11, que foi o que obteve os resultados mais consistentes/homogéneos perante os vários protocolos de recuperação antigénica efetuados. Na amostra populacional em estudo não foi encontrada uma correlação positiva entre a sobreexpressão de HER-2 e o grau de malignidade, o tipo histopatológico do tumor ou outros possíveis indicadores de prognóstico, ficando assim por esclarecer a relação deste subtipo tumoral com o prognóstico nos tumores mamários caninos. Para além disto, com a confirmação da reatividade cruzada dos anticorpos anti-HER-2 humano em tecidos de tumor mamário canino, foi possível concluir que os anticorpos 4B5 e CB11 poderão ser utilizados na determinação do *status* do HER-2 na cadela, trazendo novas hipóteses para desenvolvimento de conhecimento e de ferramentas de diagnóstico específicas para os carcinomas mamários caninos.

## Bibliografia

- Ahern, T.E., Bird, R.C., Allison, E., Bird, E.C. & Wolfe, L.G. (1996). Expression of the oncogene c-erbB2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. *Amer J Vet Res*, 57 (5), 693-696.
- Akiyama, T., Sudo, C., Ogawara, H., Toyoshima, K. & Yamamoto, T. (1986). The product of the human c-HER-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science*, 232 (4758), 1644-1646.
- Andrade, F.H., Figueiroa, F.C., Bersano, P.R., Bissacot, D.Z., Rocha, N.S. (2010). Malignant mammary tumors in female dogs: environmental contaminants. *Diagnostic Pathology*, 5, 45.
- Andrechek, E.R., White, D. & Muller, W.J. (2005). Targeted disruption of HER-2/Neu in the mammary epithelium results in impaired ductal outgrowth. *Oncogene*, 24(5), 932-937.
- Banks, W.J. (1993). Integumentary system. In W.J. Banks (Ed.) *Applied veterinary histology* (3rd Ed.). U.S.A: Mosby.
- Barone, R. (1976). *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Lyon: Laboratoire d'Anatomie. Ecole Nationale Veterinaire.
- Baulida, J., Kraus, M.H., Alimandi, M., Di Fiore, P.P. & Carpenter G. (1996). All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(9), 5251–5257.
- Bears, J.J., Schulman, F.Y., Carter, D. (2012) Histologic, immunohistochemical and clinical features of 27 mammary tumors in 18 male dogs. *Vet Pathol*, 49 (4), 602-607
- Beckmann, M.W., Niederacher, D., Schnürch, H-G., Gusterson, B.A. & Bender, H.G. (1997). Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med*, 75, 429–439.
- Benjamin, S.A., Lee, A.C., Saunders, W.J. (1999) Classification and behavior of canine mammary epithelial neoplasms based on life-span observations in beagles, *Vet Pathol*, 36, 423–436.
- Benusiglio, P.R. (2007). Focus on HER-2. *Pharmacogenomics*, 9 (7), 825–828.
- Benusiglio, P.R., Lesueur, F., Luccarini, C., Conroy, D.M., Shah, M., Easton, D.F., Day, N.E., Dunning, A.M., Pharoah, P.D. & Ponder BA.(2005) Common HER-2 polymorphisms and risk of breast cancer in a white British population: a case-control study. *Breast Cancer Research*, 7(2): R204–209.
- Brodey, R.S., Goldschmidt, M.H., Roszel, J.R. (1983) Canine mammary gland neoplasms. *J Am Anim Hosp Assoc*, 19, 61–90.
- Browne, B.C., O'Brien, N., Duffy, M.J., Crown, J. & O'Donovan, N. (2009). HER-2 signaling and inhibition in breast cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 9(3): 419-438.
- Carolyn, J. H. (2009). Mammary cancer. In D.B., John, C.T., David (Eds), *Kirk's current veterinary therapy* (14th Ed.) Missouri: Saunders Elsevier.
- Cassali, G.D., Gobbi, H., Malm, C. & Schmitt, F.C. (2007). Evaluation of accuracy of fine needle aspiration cytology for diagnosis of canine mammary tumours: comparative features with human tumours. *Cytopathology*, 18, 191–196.



- Chang, S.C., Chang, C.C., Chang, T.J., Wong, M.L. (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc*, 227,1625–1629.
- Chang, C.C., Tsai, M.H., Liao, J.W., Chan, J.P., Wong, M.L. & Chang, S.C. (2009) Evaluation of hormone receptor expression for use in predicting survival of female dogs with malignant mammary gland tumors. *J Am Vet Med Assoc*, 235,391–396.
- Cheang, M.C., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S, McKinney, S., Chia, S.K., Perou, C.M., Nielsen, T.O. (2008) Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*, 1, 14(5), 1368-76.
- Clemente, M., Perez-Alenza, M.D., Illera, J.C., Peña, L. (2010). Histological, immunohistological, and ultrastructural description of vasculogenic mimicry in canine mammary cancer. *Vet Pathol*, 47, 265–274.
- Costa, M.M. (2011) *Estudo epidemiológico e anatomo-patológico de tumores mamários na cadela e na gata*. Dissertação de Mestrado Integrado. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Coussens, L., Yang-Feng, T.L., Liao, Y.C., Chen, E., Gray, A., McGrath, J., Seeburg, P.H., Libermann, T.A., Schlessinger, J., Francke, U. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science*, 230(4730), 1132-9.
- Christianson, T.A., Doherty, J.K., Lin, Y.J., Ramsey, E.E., Holmes, R., Keenan, E.J. & Clinton, G.M. (1998). NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res*, 58(22), 5123-9.
- Cunningham, J.G (2007). The mammary gland. In J.G. Cunningham & G.K. Bradley, *Textbook of veterinary physiology* (4th Ed.) Missouri: Saunders Elsevier.
- D'Alfonso, T.M., Liu, Y.F., Chen, Z., Chen, Y.B., Cimino-Mathews, A. & Shin, S.J. (2013) SP3, a reliable alternative to HercepTest in determining HER-2/neu status in breast cancer patients. *J Clin Pathol*, 66(5):409-14.
- Daly, J.M., Jannot, C.B., Beerli, R.R., Graus-Porta, D., Maurer, F.G., Hynes, N.E. (1997). Neu differentiation factor induces HER-2 downregulation and apoptosis of HER-2-overexpressing breast tumor cells. *Cancer Research*, 57(17), 3804-3811.
- De Potter, C.R., Schelfhout, A.M., Verbeek, P., Lakhani, S.R., Brunken, R., Schroeter, C.A., Van den Tweel, J.G., Schauer, A.J. & Sloane, J.P. (1995). Neu overexpression correlates with extent of disease in large cell ductal in situ carcinoma of the breast. *Human Pathology*, 26(6), 601–606.
- Dobson, J.M., Samuel, S., Milstein, H., Rogers, K., Wood, J.L.N. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs, *J Small Anim Pract*, 43, 240–246.
- Donnay, I., Rauis, J., Devleeschouwer, N., Wouters-Ballman, P., Leclercq, G., Verstegen, J. (1995). Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs, *Am J Vet Res*, 56:1188–1194, 1.
- Dorn, C.R., Taylor, D.O., Schneider, R., Hibbard, H.H., Klauber M.R. (1968) Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J Natl Cancer Inst*, 40, 307–318.

- Dos Santos, A.A.F. (2012) *Study of prognostic factors in canine mammary gland tumours*. Dissertação de Doutorado em Ciências Veterinárias. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto.
- Dutra, A.P., Granja, N.V., Schmitt, F.C & Cassali, G.D. (2004). c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res*, 37(11), 1673-8.
- East of Scotland Regional Genetics Service (2003). *Molecular Cytogenetics: HER-2 FISH*. Acedido em Agosto 20, 2013, disponível em: <http://humangenetics.org.uk/molecular-cytogenetics/>
- Egenvall, A., Bonnett, B.N., Ohagen, P., Olson, P., Hedhammar, A., von Euler, H. (2005) Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med*, 69, 109–127.
- Elston, C.W., Ellis, I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19, 403–410.
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J.A., Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev*, 38(6), 698-707.
- Euler, H.V (2011). Tumours of the mammary glands. In J. M. Dobson & B. D. Lascelles, *BSAVA Manual of canine and feline oncology*. (3th Ed.)
- Ežerskyte, A., Zamokas, G. Grigonis, A., Juodžiukynienė (2011). The retrospective analysis of mammary tumours in dogs. *Vet Med Zoot*, 75, 3-8.
- Finkle, D., Quan, Z.R., Asghari, V., Kloss, J., Ghaboosi, N., Mai, E., Wong, W.L., Hollingshead, P., Schwall, R., Koeppen, H. & Erickson, S. (2004). HER-2-targeted therapy reduces incidence and progression of midlife mammary tumors in female murine mammary tumor virus huHER-2-transgenic mice. *Clinical Cancer Research*, 10(7): 2499-2511.
- Gama, A., Alves, A. Schmitt, F. (2008). Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch*, 453, 123-132.
- Garratt, A.N., Ozcelik, C. & Birchmeier, C. (2003). HER-2 pathways in heart and neural diseases. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 13(2), 80- 86.
- Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R. & Lemke, G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature*, 378(6555), 390-394.
- Getty, R. (1981). Aparelho urogenital dos carnívoros. In R., Getty (Ed). *Sisson/grossman - anatomia dos animais domésticos* (5ª edição). Rio de Janeiro: Interamericana.
- Goldschmidt, M., Pena, L., Rasotto, R. & Zappulli, V. (2011) Classification and grading of canine mammary tumors, *Vet Pathol*, 48, 117–131.
- Guil-Luna, S., Sanchez-Céspedes, R., Millan, Y., De Andres, F.J., Rollon, E., Domingo, V., Guscetti, F. & Martín de Las Mulas, J., (2011). Aglepristone decreases proliferation in progesterone receptor-positive canine mammary carcinomas. *J Vet Intern Med*, 25, 518–523.
- Gutierrez, C. & Schiff R. (2011). HER-2: biology, detection, and clinical implications. *Arch Pathol Lab Med*, 135 (1), 55-62.

- Hampe, J.F., Misdorp, W. (1974) Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull World Health Organ*, 50(1-2), 111-33.
- Histology-World (2013). *Histology-World! - Breast Histology*. Acedido em Junho 20, 2013, disponível em: <http://histology-world.com/photoalbum/thumbnails.php?album=52>.
- Hsu, W.L., Huang, H.M., Liao, J.W., Wong, M.L., Chang, S.C. (2009) Increased survival in dogs with malignant mammary tumours overexpressing HER-2 protein and detection of a silent single nucleotide polymorphism in the canine HER-2 gene. *Vet J.*, 180(1), 116-23.
- Hynes, N.E. & Lane, H.A. (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews in Cancer*, 5(5), 341-354.
- Jabara, A.G. (1969). Two cases of mammary neoplasms arising in male dogs. *Aust Vet J.*, 45, 476-480.
- Jablonski, L. (2008). *Jabloski Diagram – HER-2 Protein*. Acedido em Setembro 1, 2013, disponível em: <http://www.jablonskidiagram.com/illust.html>.
- Jo, U.H., Han, S.G.L., Seo, J.H., Park, K.H., Lee JW, Lee HJ, Ryu JS & Kim YH. (2008). The genetic polymorphisms of HER-2 and the risk of lung cancer in a Korean population. *BMC Cancer*, 8, 359.
- Jones, J.T., Akita, R.W. & Sliwkowski, M.X. (1999) Binding specificities and affinities of egf domains for ErbB receptors. *FEBS Lett*, 447 (2-3), 227-31.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2008). Aparelho reprodutor feminino. In L. C., Junqueira & J., Carneiro (Eds), *Histologia básica* (11ª edição). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C., Dessiris, A. (2001). Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 48, 85–96.
- Karayannopoulou, M., Kaldrymidou, E., Constantinidis, T.C., Dessiris, A. (2005) Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol*, 133, 246–252.
- Kim, J.H., Im, K.S., Kim, N.H., Yhee, J.Y., Nho, W.G., Sur, J.H. (2011) Expression of HER-2 and nuclear localization of HER-3 protein in canine mammary tumors: histopathological and immunohistochemical study. *Vet J.* 189(3), 318-22.
- King, R.J.B. & Robins, M.W. (2006). Responding to the environment: growth regulation and signal transduction. In R.J.B, King & M.W.Robins (Eds), *Cancer biology* (3rd edition). England: Pearson Education Limited.
- König, H.E., (2002). Glândula mamária nos animais domésticos. In H.E., König, H. Liebich, *Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido*. Porto Alegre: Artmed.
- Kraus, M.H., Issing, W., Mik, i T., Popescu, N.C, Aaronson, S.A. (1989) Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(23), 9193-9197.
- Kurzman, I.D., Gilbertson, S.R. (1986) Prognostic factors in canine mammary tumors. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*, 1, 25–32.
- Lenferink, A.E., Pinkas-Kramarski, R., van de Poll, M.L., van Vugt, M.J., Klapper, L.N., Tzahar, E., Waterman, H., Sela, M., van Zoelen, E.J., Yarden, Y. (1998). Differential

endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *The EMBO Journal*, 17(12), 3385–3397.

- Liu, J., Chang, K., Lo, C., Chu, P. & Liu (2013). Expression of autophagy-related protein beclin-1 in malignant canine mammary tumors. *BMC Veterinary Research*, 9, 75
- Lombardi, P., Florio, S., Pagnini, U., Crispino, A., Avallone, L., (1999). Ovarian function suppression with a GnRH analogue: Dser(But[t])[6]-Arzgly[10]-LHRH (Goserelin) in hormone dependent canine mammary cancer. *J Vet Pharmacol Ther*, 22, 56–61.
- Macphail, C.M. (2013) Surgery of the Reproductive and Genital Systems - Mammary Neoplasia. In T.W. Fossum, C.W Dewey, C.V. Horn, A.L. Johnson, C.M. Macphail, M. G. Radlinsky, K. S. Schulz, M. D. Willard (Ed.) *Small animal surgery*. (4th Ed.) Missouri: Saunders Elsevier.
- Marconato, L., Lorenzo, R.M., Abramo, F., Ratto, A., Zini, E. (2008). Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs, *Vet Comp Oncol*, 6, 90–101.
- Martín de las Mulas, J., Ordás, J., Millán, Y., Fernández-Soria, V. & Ramón y Cajal, S. (2003). Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Breast Cancer Res Treat*, 80(3), 363-7.
- Martín de las Mulas J.M., Millan, Y., Dios, R. (2005) A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor alpha and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. *Vet Pathol*, 42, 200–212.
- McGeady, T.A. (2006). Male and female reproductive systems – development of the mammary gland. In T.A., McGeady, P.J., Quinn, E.S., FitzPatrick, & M.T. Ryan, *Veterinary embryology*. Oxford: Blackell Publishing.
- Merlo, D.F., Rossi, L., Pellegrino, C., Ceppi, C., Cardellina, U., Capurro, C., Ratto, A., Sambucco, P.L., Sestito, V., Tanara, G., Brocchini, V. (2008) Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *J Vet Intern Med*, 22, 976–984.
- Misdorp, W., Hart, A.A., (1979). Canine mammary cancer. II. Therapy and causes of death. *J Small Anim Pract*, 20, 395–404.
- Misdorp, W. (2002). Tumours of the mammary gland. In, D.J. Meuten (Ed.), *Tumors in domestic animals* (4th Edition). Iowa State Press, Blackwell Publishing Company.
- Misdorp, W., Else, R. W., Hellmén, E. & Lipscomb, T. P. (1999). Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. In World Health Organization international histological classification of tumors of domestic animals (2nd ed., Vol. VII). Washington, D. C.: Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology.
- Moasser, M.M. (2007). The oncogene HER-2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, 26(45), 6469-6487.
- Moe, L. (2001): Population-based incidence of mammary tumours in some dog breeds. *J Reprod Fertil Suppl* 57, 439–443.
- Moore A.S. & Frimberger, A.E. (2010). Mammary carcinoma in dogs. In A.S. Moore & A. E. Frimberger (Eds), *Oncology for veterinary technicians and nurses*. Iowa: Blackell Publishing.

- Morris, J.S., Dobson, J.M. & Bostock, D.E. (1993). Use of tamoxifen in the control of canine mammary neoplasia. *Vet Rec*, 133, 539- 542.
- Morris, J. (2001). Mammary gland. In J., Morris, J. Dobson (Eds.), *Small animal oncology*. Oxford: Blackwell Science.
- Moulton, J.E. (1990). Tumors of the mammary gland. In J.E. Moulton (Ed), *Tumors in domestic animals* (3rd Edition), California: University of California Press.
- Murua Escobar, H., Becker, K., Bullerdiek, J., (2001). The canine HER-2 gene maps to a chromosome region frequently affected by aberrations in tumors of the dog (*Canis familiaris*). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 94, 194–195.
- Nelson, S.E., Gould, M.N., Hampton, J.M., Trentham-Dietz, A. (2005). A case–control study of the HER-2 Ile655Val polymorphism in relation to risk of invasive breast cancer. *Breast Cancer Research*, 7(3), R357–R364.
- Nieto, A., Peña, L., Pérez-Alenza, M.D., Sánchez, M.A., Flores, J.M. & Castaño, M. (2000) Immunohistologic detection of estrogen receptor alpha in canine mammary tumors: clinical and pathologic associations and prognostic significance. *Vet Pathol*, 37, 239–247.
- Nunes, C.B., Rocha, R.M., Buzelin, M.A., Balabram, D., de Souza Foureaux, F., Porto, S.S. & Gobbi, H. (2013). False positivity in HER-2 testing of breast cancer: novel paths for approaching an old dilemma. *J Clin Pathol*. 2013 Jul 18. [Epub ahead of print]
- Otoni, C.C, Rahal, S.C, Vulcano, L.C., Ribeiro, S.M., Hette, K., Giordano, T., Doiche D.P. & Amorim, R.L. (2010). Survey radiography and computerized tomography imaging of the thorax in female dogs with mammary tumors, *Acta Vet Scand*, 52, 20.
- Owen, L. (1980) *TNM classification of tumors in domestic animals*, World Health Organization, Geneva.
- Pal, S.K., Pegram, M. (2007). HER-2 targeted therapy in breast cancer... beyond Herceptin. *Reviews in Endocrinology and Metabolic Disorders*, 8(3), 269-277.
- Papewalis, J., Nikitin, A. & Rajewsky, M.F. (1991). G to A polymorphism at amino acid codon 655 of the human erbB-2/HER-2 gene. *Nucleic Acids Research*, 19(19), 5452.
- Papouchado, B.G., Myles, J., Lloyd, R.V., Stoler, M., Oliveira, A. M., Downs-Kelly, E., Morey, Adrienne, D., Bilous, Michael M., Nagle, R, Prescott, N., Wang, L., Dragovich, L., McElhinny, A., Garcia, C.F., Ranger-Moore, J., Free, H., Powell, W., Loftus, M., Pettay, J., Gaire, F., Roberts, C., Dietel, M., Roche, P., Grogan, T. & Tubbs, R. (2010) Silver in situ hybridization (SISH) for determination of HER-2 gene status in breast carcinoma: comparison with fish and assessment of interobserver reproducibility. *American Journal of Surgical Pathology*, 34 (6), 767-776
- Park, K., Han, S., Kim, J.Y., Kim, H.J., Kwon, J.E. & Gwak, G. (2011). Silver-enhanced in situ hybridization as an alternative to fluorescence in situ hybridization for assaying HER-2 amplification in clinical breast cancer. *J Breast Cancer*, 14(4), 276-82.
- Park, K., Kim, J., Lim, S., Han, S. & Lee, J.Y. (2003). Comparing fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization methods to determine the HER-2/neu status in primary breast carcinoma using tissue microarray. *Mod Pathol*, 16(9), 937-43.
- Peleteiro, M.C. (1994). Tumores mamários na cadela e na gata. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, LXXXIX(509), 10-34.

- Pérez-Alenza, M.D., Peña, L., Nieto, A.I., Castaño, M. (1997) Clinical and pathological prognostic factors in canine mammary tumors. *Ann Ist Super Sanita*, 33(4), 581-5.
- Pérez-Alenza, M.D., Peña, L., Castaño, M. Nieto, A.I., (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *Journal of Small Animal Practice*, 41, 287-291.
- Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T, Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lonning, P.E., Borresen-Dale, A.L., Brown, P.O. & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–52.
- Peruzzi, D., Mesiti, G., Ciliberto, G., La Monica, N., Aurisicchio, L. (2010). Telomerase and HER-2/neu as targets of genetic cancer vaccines in dogs. *Vaccine*, 28 1201–1208.
- Philibert, J.C., Snyder, P.W., Glickman, N., Glickman, L.T., Knapp, D.W., Waters, D.J. (2003). Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors, *J Vet Intern Med* 17:102–106.
- Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B.J., Sela, M. & Yarden Y. (1996); Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *The EMBO Journal*, 15(10), 2452–2467.
- Press, M.F., Cordon-Cardo, C. & Slamon, D.J. (1990) Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene*, 5(7), 953-962.
- Press, M.F., Hung, G., Godolphin, W. & Slamon, D.J. (1994). Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res*, 54(10), 2771-7.
- Press, M.F., Slamon, D.J., Flom, K.J., Park, J., Zhou, J. & Bernstein, L. (2002) Evaluation of HER-2/neu gene amplification and overexpression: comparison of frequently used assay methods in a molecularly characterized cohort of breast cancer specimens, *J Clin Oncol*, 20, 3095-3105.
- Quirke, P., Pickles, A., Tuzi, N.L., Mohamdee, O. & Gullick, W.J. (1989). Pattern of expression of cerbB-2 oncoprotein in human fetuses. *British Journal of Cancer*, 60(1), 64–69.
- Ricardo, S.A.V., Milanezi, F., Carvalho, S.T., Aguilera, D.R. & Schmitt, F.C.L. (2007). HER-2 evaluation using the novel rabbit monoclonal antibody SP3 and CISH in tissue microarray of invasive breast carcinomas. *J Clin Pathol*, 60, 1001-1005.
- Rutteman, G.R., Misdorp, W., Blankenstein, M.A. & van den Brom, W.E. (1988) Oestrogen (ER) and progestin receptors (PR) in mammary tissue of the female dog: different receptor profile in non-malignant and malignant states. *Br J Cancer*, 58(5), 594-9.
- Saini, K.S., Azim, H.A., Metzger-Filho, O., Loi, S., Sotiriou, C., de Azambuja, E., Piccart, M. (2011) Beyond trastuzumab: new treatment options for HER-2-positive breast cancer. *The Breast*, 20, 20–27.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F. & Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology /Hematology*, 19(3), 183–232.
- Sassi, F., Benazzi, C., Castellani, G., Sassi, G. (2010). Molecular-based tumour subtype of canine mammary carcinomas assessed by immunohistochemistry. *BMC Veterinary Research*, 6:5.

- Scaltriti, M., Rojo, F., Ocaña, A. Anido, J., Guzman, M., Cortes, J., Di Cosimo, S., Matias-Guiu, X., Ramon y Cajal, S., Arribas, J. & Baselga, J. (2007). Expression of p95HER-2, a truncated form of the HER-2 receptor, and response to anti-HER-2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 99(8), 628-38.
- Schechter, A.L., Stern, D.F., Vaidyanathan, L., Decker, S.J., Drebin, J.A., Greene, M.I., Weinberg, R.A., (1984) The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*, 312(5994), 513-6.
- Schneider, R., Dorn, C.R, Taylor, D.O. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival, *J Natl Cancer Inst*, 43,1249–1261.
- Schneider, R. (1970). Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer*, 26, 419–426.
- Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K. & Yamamoto, T. (1985) A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(19), 6497–6501.
- Shofer, F.S., Sonnenschein, E.G., Goldschmidt, M.H., Laster, L.L., Glickman, L.T. (1989) Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 13(1), 49-60.
- Simon, D., Schoenrock, D., Baumgartner, W. & Nolte, I. (2006). Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel, *J Vet Intern Med*, 20, 1184–1190.
- Simon, D., Schoenrock, D., Nolte, I., Baumgärtner, W., Barron, R., Mischke, R. (2009) Cytologic examination offine-needle aspirates from mammary gland tumors in the dog: diagnostic accuracy with comparison to histopathology and association with postoperative outcome. *Vet Clin Pathol*, 38, 521–528.
- Singer, J., Weichselbaumer, M., Stockner, T., Mechtcheriakova, D., Sobanov, Y., Bajna, E., Wrba, F., Horvat, R., Thalhammer, J.G., Willmann, M., Jensen-Jarolim, E. (2012) Comparative oncology: ErbB-1 and ErbB-2 homologues in canine cancer are susceptible to cetuximab and trastuzumab targeting. *Mol Immunol* (4), 200-9.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. & McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785), 177-82.
- Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., et al. (1989). Studies of the HER-2/ neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244, 707-712.
- Sleeckx, K., Rooster, H., Kroeze, E.J.B.V., Van Ginneken, C. & Van Brantegem, L. (2011) Canine mammary tumours, an overview. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 1112-1131.
- Solano-Gallego, L. (2010). Reproductive System. In R.E. Raskin & D.J. Meyer (Eds), *Canine and Feline Cytology: A color atlas and interpretation* (2nd Ed) (pp. 274-309). Missouri: Saunders Elsevier.
- Sonnenschein, E.G., Glickman, L.T., Goldschmidt, M.H., McKee, L.J. (1991). Body conformation, diet, and risk of breast cancer in pet dogs: a case-control study. *Am J Epidemiol*, 133, 694–703.
- Sorenmo, K.U., Shofer, F.S., Goldschmidt, M.H. (2000) Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. *J Vet Intern Med*, 14(3), 266-70.

- Sorenmo, K. (2003). Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am*, 33, 573-596.
- Sorenmo, K.U., Kristiansen, V.M., Cofone, M.A., Shofer, F.S., Breen, A.M., Langeland, M., Mongil, C.M., Grondahl, A.M., Teije, J., Goldschmidt, M.H. (2009). Canine mammary gland tumours: a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Vet Comp Oncol*, 7, 162–172.
- Sorenmo, K. U., Rasotto, R., Zappulli, V., & Goldschmidt, M. H. (2011). Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. *Veterinary Pathology*, 48 (1), 85-97.
- Sorenmo, K.U., Worley, D.R. Goldschmidt, M.H. (2013). Tumors of the mammary gland. In S.J. Withrow, Vail, D.M., Page, R.L. *Small animal clinical oncology* (5th Ed) Missouri: Elsevier Saunders.
- Sorkin, A., Di Fiore, P.P. & Carpenter, G. (1993). The carboxyl terminus of epidermal growth factor receptor/erbB-2 chimeras is internalization impaired. *Oncogene*, 8(11), 3021–3028.
- Stuart-Harris, R., Davis, A., (2010). Optimal adjuvant endocrine therapy for early breast cancer. *Womens Health (Lond Engl)*, 6, 383–398.
- Tanner, M., Gancberg, D., Di Leo, A., Larsimont, D., Rouas, G., Piccart, MJ & Isola J. (2000). Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol*, 157, 1467–1472.
- Vascellari, M., Baioni, E., Ru, G., Carminato, A., Mutinelli, F. (2009) Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. *BMC Veterinary Research*, 5, 39-48.
- Wolff, A.C., Hammond, M.E., Schwartz, J.N., Hagerty, K.L., Allred, D.C., Cote, R.J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P.L., Hanna, W.M., Langer, A., McShane, L.M., Paik, S., Pegram, M.D., Perez, E.A., Press, M.F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S.E., Tubbs, R., Vance, G.H., van de Vijver, M., Wheeler, T.M., Hayes, D.F. & American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*, 131(1), 18-43.
- Worthylake, R., Opresko, L.K. & Wiley, H.S. (1999). ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. *Journal of Biology and Chemistry*, 274(13), 8865–8874.
- Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K., Sugiyama, M. (1996a) Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant tumours. *Journal of Small Animal Practice*, 37, 462-464.
- Yamagami, T., Kobayashi, T., Takahashi, K., Sugiyama, M. (1996b) Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification, *J Vet Med Sci*, 58, 1079–1083.
- Yarden, Y. (2001) The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*, 37 (4), 3-8.
- Yuzbasiyan-Gurkan, V., Cao, Y., Venta, P. & Yamini, B. (1999). Loss of heterozygosity at the BRCA1 locus in canine mammary carcinoma. *Proc Vet Cancer Soc*, 19, 7.



- Zhang, H., Berezov, A., Wang, Q., Zhang, G., Drebin, J., Murali, R. & Greene, M.I. (2007) ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest*, 117(8):2051-8.
- Zhan, L., Xiang, B. & Muthuswamy, SK. (2006). Controlled activation of ErbB1/HER-2 heterodimers promote invasion of three-dimensional organized epithelia in an ErbB1-dependent manner: implications for progression of HER-2-overexpressing tumors. *Cancer Research*, 66(10), 5201-5208.
- Zell, J.A., Tsang, W.Y., Taylor, T.H., Mehta, R.S. & Anton-Culver, H. (2009) Prognostic impact of human epidermal growth factor-like receptor 2 and hormone receptor status in inflammatory breast cancer (IBC): analysis of 2,014 IBC patient cases from the California Cancer Registry. *Breast Cancer Res*, 11(1), R9.
- Zuccari D.A.P.C., Santana A.E. & Rocha N.E. (2001). Correlação entre a citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários de cadelas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38 (1) 38-41.

## **Anexo I**

### **Resumo das Atividades de Estágio**

O estágio curricular foi compreendido entre os dias 1 de outubro de 2012 e 15 de março de 2013 e teve lugar no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa. Durante o estágio tive contacto com vários procedimentos e técnicas laboratoriais de diversas áreas da investigação científica, realizada em Medicina Veterinária. Tive a oportunidade de acompanhar todo o processo de colheita, análise macroscópica, processamento e análise histopatológica dos tumores mamários que constam neste estudo, podendo desenvolver aptidões técnicas e de diagnóstico. Aliado ao objetivo do trabalho experimental, pude observar e realizar todos os passos referentes à técnica de Imunohistoquímica, assim como a sua subsequente avaliação. Foi-me também dada a oportunidade de assistir às Consultas de Citologia, realizadas no Hospital Escolar da Faculdade, assim como a observação de lâminas de citologia e de histopatologia, com diagnósticos anatomopatológicos variados. Pude, ainda, assistir e auxiliar em várias necropsias, realizadas ao longo do estágio. Para além da experiência obtida no departamento de Anatomia Patológica, foi-me proporcionada a oportunidade de ter contacto com as técnicas de vários outros laboratórios de Investigação Veterinária, como o caso da Parasitologia e Cultura de Células. Ao longo do estágio tive, também, a oportunidade de colaborar num projeto de um aluno de doutoramento do Instituto Superior Técnico, relacionado com a cultura de células tumorais de tumor mamário canino.

Tive ainda a oportunidade de realizar um estágio extracurricular, na área de clínica, no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, Universidade de Lisboa. Este estágio teve a duração de 2 meses, entre 18 de março e 17 de maio, e englobou turnos diários de 8 horas mínimas e turnos rotativos, na unidade de internamento, com a duração de 24 horas. Pude estar na área de Medicina Interna, onde assisti e auxiliei nas consultas de primeira opinião, consultas de referência e nas consultas de 2ª opinião, onde se destacaram as especialidades de Dermatologia, Oncologia, Oftalmologia e Endocrinologia. Na Cirurgia, foi-me proporcionada a exposição a procedimentos, métodos e materiais cirúrgicos. Na área de internamento, auxiliei a equipa médica e de enfermagem na prestação de cuidados a animais em tratamento e no período pós-cirúrgico.

## Anexo II

### Resultados Imunohistoquímica

Tabela 13. Resultados da classificação da imunoreatividade de HER-2 em todos os protocolos realizados.

Caso	Mw Tris EDTA SP3	Mw Tris EDTA 4B5	Mw Tris EDTA CB11	PP 2atm 2' SP3	PP 2atm 2' 4B5	PP 2atm 2' CB11	BM 60' SP3	BM 60' 4B5	BM 60' CB11	D.Enzim. TAB250
1	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1+	0	2+	2+	0	0	2+	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	2+	0	1+	1+	0	0	2+	0
5	0	0	1+	0	1+	0	0	0	1+	0
6	1+	1+	3+	1+	3+	3+	0	0	3+	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	1+	0	0	2+	0	0	0	0
9	0	0	1+	0	1+	1+	0	0	2+	0
10	0	0	1+	1+	0	2+	0	0	0	0
11	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	2+	0	1+	1+	0	0	1+	0
13	0	0	1+	0	2+	2+	0	0	2+	0
14	0	0	1+	0	0	1+	0	0	0	0
15	0	0	1+	0	2+	2+	0	1+	2+	0
16	0	0	2+	0	0	2+	0	0	1+	0
17	0	0	2+	1+	2+	2+	0	0	2+	0
18	2+	2+	2+	1+	3+	3+	0	0	2+	0
19	1+	2+	2+	0	1+	1+	0	0	0	0
20	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	2+	0	0	1+	0	0	0	0
Controlo +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controlo -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## Anexo III

### Estatística

**Tabela 14.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 e o método de recuperação antigénica utilizada para o anticorpo CB11.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Positiva	Negativa	
Recuperação Antigénica	Micro-ondas	Observados	8	13	21
		Esperados	8,3	12,7	
	Panela de Pressão	Observados	9	12	21
		Esperados	8,3	12,7	
	Banho-Maria	Observados	8	13	21
		Esperados	8,3	12,7	
Total			25	38	63
		Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson		0.133	2	0.936	

**Tabela 15.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 e o método de recuperação antigénica utilizada para o anticorpo 4B5.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Positiva	Negativa	
Recuperação Antigenica	Micro-ondas	Observados	2	19	21
		Esperados	2,7	18,3	
	Panela de Pressão	Observados	6	15	21
		Esperados	2,7	18,3	
	Banho-Maria	Observados	0	21	21
		Esperados	2,7	18,3	
Total			8	55	63
		Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson		8,018	2	0,018	

**Tabela 16.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 e o método de recuperação antigénica utilizada para o anticorpo SP3.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Positiva	Negativa	
Recuperação Antigénica	Micro-ondas	Observados	1	20	21
		Esperados	0,3	20,7	
	Panela de Pressão	Observados	0	21	21
		Esperados	0,3	20,7	
	Banho-Maria	Observados	0	21	21
		Esperados	0,3	20,7	
Total			1	62	63
		Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson		2.032	2	0.362	

**Tabela 17.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Micro-ondas) e a idade das cadelas.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Idade	<9 Anos	Observados	3	4	7
		Esperados	4,3	2,7	
	≥9 Anos	Observados	10	4	14
		Esperados	8,7	5,3	
Total			13	8	21
			Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)
Chi-quadrado de Pearson			1,615	1	0,204

**Tabela 18.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Panela de Pressão) e a idade das cadelas.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Idade	<9 Anos	Observados	3	4	7
		Esperados	4	3	
	≥9 Anos	Observados	9	5	14
		Esperados	8	6	
Total			12	9	21
			Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)
Chi-quadrado de Pearson			0,875	1	0,350

**Tabela 19.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+ Banho-Maria) e a idade das cadelas.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Idade	<9 Anos	Observados	2	5	7
		Esperados	4,3	2,7	
	≥9 Anos	Observados	11	3	14
		Esperados	8,7	5,3	
Total			13	8	21
			Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)
Chi-quadrado de Pearson			4,947	1	0,041

**Tabela 20.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5 + Micro-ondas) e a idade das cadelas.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Idade	<9 Anos	Observados	6	1	7
		Esperados	6,3	7	
	≥9 Anos	Observados	13	1	14
		Esperados	12,7	1,3	
Total			19	2	21
			Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)
Chi-quadrado de Pearson			0,276	1	0,0599

**Tabela 21.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5 + Panela de Pressão) e a idade das cadelas.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Idade	<9 Anos	Observados	3	4	7
		Esperados	5	2	
	≥9 Anos	Observados	12	2	14
		Esperados	10	4	
Total			15	6	21
Chi-quadrado de Pearson			Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)
			4,200	1	0,064

**Tabela 22.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (SP3 + Micro-ondas) e a idade das cadelas.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Idade	<9 Anos	Observados	7	0	7
		Esperados	6,7	0,3	
	≥9 Anos	Observados	13	1	12
		Esperados	13,3	0,7	
Total			20	1	21
Chi-quadrado de Pearson			Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)
			0,525	1	0,469

**Tabela 23.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+ Micro-ondas) e a localização do tumor.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Localização	Torácicas	Observados	5	1	6
		Esperados	3,7	2,3	
	Abdominais	Observados	6	4	10
		Esperados	6,2	3,8	
	Inguinais	Observados	1	1	2
		Esperados	1,2	,8	
	Entre torácicas e abdominais	Observados	0	1	1
		Esperados	,6	,4	
	Entre abdominais e inguinais	Observados	1	1	2
		Esperados	1,2	,8	
Total			13	8	21
Chi-quadrado de Pearson			Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)
			3,049	4	0,550

**Tabela 24.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+ Panela de Pressão) e a localização do tumor

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Localização	Torácicas	Observados	4	2	6
		Esperados	3,4	2,6	
	Abdominais	Observados	5	5	10
		Esperados	5,7	4,3	
	Inguinais	Observados	1	1	2
		Esperados	1,1	,9	
	Entre torácicas e abdominais	Observados	1	0	1
		Esperados	,6	,4	
	Entre abdominais e inguinais	Observados	1	1	2
		Esperados	1,1	,9	
Total			12	9	21
		Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson		1,264	4	0,867	

**Tabela 25.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+ Banho-Maria) e a localização do tumor

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Localização	Torácicas	Observados	4	2	6
		Esperados	3,7	2,3	
	Abdominais	Observados	6	4	10
		Esperados	6,2	3,8	
	Inguinais	Observados	1	1	2
		Esperados	1,2	,8	
	Entre torácicas e abdominais	Observados	0	1	1
		Esperados	,6	,4	
Entre abdominais e inguinais	Observados	2	0	2	
	Esperados	1,2	,8		
Total			13	8	21

		Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson		3.049	4	0.550	

**Tabela 26.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+ Micro-ondas) e a localização do tumor

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Localização	Torácicas	Observados	6	0	6
		Esperados	5,4	,6	
	Abdominais	Observados	8	2	10
		Esperados	9,0	1,0	
	Inguinais	Observados	2	0	2
		Esperados	1,8	,2	
	Entre torácicas e abdominais	Observados	1	0	1
		Esperados	,9	,1	
	Entre abdominais e inguinais	Observados	2	0	2
		Esperados	1,8	,2	
Total			19	2	21
			Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)
Chi-quadrado de Pearson			2,432	4	0,657

**Tabela 27.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+ Panela de Pressão) e a localização do tumor

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Localização	Torácicas	Observados	5	1	6
		Esperados	4,3	1,7	
	Abdominais	Observados	6	4	10
		Esperados	7,1	2,9	
	Inguinais	Observados	1	1	2
		Esperados	1,4	,6	
	Entre torácicas e abdominais	Observados	1	0	1
		Esperados	,7	,3	
	Entre abdominais e inguinais	Observados	2	0	2
		Esperados	1,4	,6	
Total			15	6	21
			Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)
Chi-quadrado de Pearson			2,2707	4	0,608



**Tabela 28.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (SP3+ Micro-ondas) e a localização do tumor

				Sobreexpressão HER2		Total
				Negativa	Positiva	
Localização	Torácicas	Observados		6	0	6
		Esperados		5,7	,3	
	Abdominais	Observados		9	1	10
		Esperados		9,5	,5	
	Inguinais	Observados		2	0	2
		Esperados		1,9	,1	
	Entre torácicas e abdominais	Observados		1	0	1
		Esperados		1,0	,0	
	Entre abdominais e inguinais	Observados		2	0	2
		Esperados		1,9	,1	
Total				20	1	21
			Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson			1.155	4	0.885	

**Tabela 29.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Micro-ondas) e o grau de malignidade do tumor.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Grau de Malignidade	I	Observados	4	2	6
		Esperados	3,7	2,3	
	II	Observados	6	5	11
		Esperados	6,8	4,2	
	III	Observados	3	1	4
		Esperados	2,5	1,5	
Total			13	8	21
		Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson		0.601	2	0.740	

**Tabela 30.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Panela de Pressão) e o grau de malignidade do tumor.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Grau de Malignidade	I	Observados	3	3	6
		Esperados	3,4	2,6	
	II	Observados	6	5	11
		Esperados	6,3	4,7	
	III	Observados	3	1	4
		Esperados	2,3	1,7	
Total			12	9	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson	0,676	2	0,713	

**Tabela 31.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Banho-Maria) e o grau de malignidade do tumor.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Grau de Malignidade	I	Observados	4	2	6
		Esperados	3,7	2,3	
	II	Observados	6	5	11
		Esperados	6,8	4,2	
	III	Observados	3	1	4
		Esperados	2,5	1,5	
Total			13	8	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson	0.601	2	0.740	

**Tabela 32.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+Micro-ondas) e o grau de malignidade do tumor.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Grau de Malignidade	I	Observados	5	1	6
		Esperados	5,4	,6	
	II	Observados	10	1	11
		Esperados	10,0	1,0	
	III	Observados	4	0	4
		Esperados	3,6	,4	
Total			19	2	21
		Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson		0.779	2	0.677	

**Tabela 33.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+Panela de Pressão) e o grau de malignidade do tumor.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Grau de Malignidade	I	Observados	4	2	6
		Esperados	4,3	1,7	
	II	Observados	8	3	11
		Esperados	7,9	3,1	
	III	Observados	3	1	4
		Esperados	2,9	1,1	
Total			15	6	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson	0,101	2	0,951	

**Tabela 34.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (SP3+Micro-ondas) e o grau de malignidade do tumor.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Grau de Malignidade	I	Observados	5	1	6
		Esperados	5,7	,3	
	II	Observados	11	0	11
		Esperados	10,5	,5	
	III	Observados	4	0	4
		Esperados	3,8	,2	
Total			20	1	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson	2,625	2	0,269	

**Tabela 35.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Micro-ondas) e o tipo histológico.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Tipo histológico	Carcinomas simples	Observados	11	6	17
		Esperados	10,5	6,5	
	Carcinomas complexos	Observados	2	2	4
		Esperados	2,5	1,5	
Total			13	8	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson	0,297	1	0,586	

**Tabela 36.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Panela de Pressão) e o tipo histológico.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Tipo histológico	Carcinomas simples	Observados	11	6	17
		Esperados	9,7	7,3	
	Carcinomas complexos	Observados	1	3	4
		Esperados	2,3	1,7	
Total			12	9	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)
Chi-quadrado de Pearson	2.085	1	0.149

**Tabela 37.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Banho-Maria) e tipo o histológico.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Tipo histológico	Carcinomas simples	Observados	12	5	17
		Esperados	10,5	6,5	
	Carcinomas complexos	Observados	1	3	4
		Esperados	2,5	1,5	
Total			13	8	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson	2,854	1	0,091	

**Tabela 38.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+Micro-ondas) e o tipo histológico.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Tipo histológico	Carcinomas simples	Observados	16	1	17
		Esperados	15,4	1,6	
	Carcinomas complexos	Observados	3	1	4
		Esperados	3,6	,4	
Total			19	2	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson	1.373	1	0.241	

**Tabela 39.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+Panela de Pressão) e o tipo histológico.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
Tipo histológico	Carcinomas simples	Observados	14	3	17
		Esperados	12,1	4,9	
	Carcinomas complexos	Observados	1	3	4
		Esperados	2,9	1,1	
Total			15	6	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson	5,219	1	0,053	

**Tabela 40.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Micro-ondas) e diferenciação mesenquimatosa benigna.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
D. M. B.	Sim	Observados	3	4	7
		Esperados	4,3	2,7	
	Não	Observados	10	4	14
		Esperados	8,7	5,3	
Total			13	8	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson	1.615	1	0.204	

**Tabela 41.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Panela de Pressão) e diferenciação mesenquimatosa benigna.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
D. M. B.	Sim	Observados	7	0	7
		Esperados	4,0	3,0	
	Não	Observados	5	9	14
		Esperados	8,0	6,0	
Total			12	9	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson	7.875	1	0.047	

**Tabela 42.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (CB11+Banho-Maria) e diferenciação mesenquimatosa benigna.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
D. M. B.	Sim	Observados	6	1	7
		Esperados	4,3	2,7	
	Não	Observados	7	7	14
		Esperados	8,7	5,3	
Total			13	8	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson	2,524	1	0,112	

**Tabela 43.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+Micro-ondas) e diferenciação mesenquimatosa benigna.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
D. M. B.	Sim	Observados	6	1	7
		Esperados	6,3	,7	
	Não	Observados	13	1	14
		Esperados	12,7	1,3	
Total			19	2	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)
Chi-quadrado de Pearson	0,276	1	0,599

**Tabela 44.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (4B5+Panela de Pressão) e diferenciação mesenquimatosa benigna.

			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
D. M. B.	Sim	Observados	7	0	7
		Esperados	5,0	2,0	
	Não	Observados	8	6	14
		Esperados	10,0	4,0	
Total			15	6	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)	
Chi-quadrado de Pearson	4,200	1	0,04	

**Tabela 45.** Relação entre a sobreexpressão de HER2 (SP3+Micro-ondas) e diferenciação mesenquimatosa benigna.


			Sobreexpressão HER2		Total
			Negativa	Positiva	
D. M. B.	Sim	Observados	7	0	7
		Esperados	6,7	,3	
	Não	Observados	13	1	14
		Esperados	13,3	,7	
Total			20	1	21

	Valor	gl	Asymp. Sig. (2-sided)
Chi-quadrado de Pearson	0,525	1	0,469

## Anexo IV

### Trabalhos apresentados em congressos:

- a. *Poster* apresentado no Congresso Anual da ESVONC 2013 (30-31 de maio & 1 de junho, Lisboa, Portugal)



### EVALUATION OF HER-2 ONCOPROTEIN STATUS IN CANINE MAMMARY TUMORS

Soares, Maria; Beselga, André; Correia, Jorge; Carvalho, Sandra; Peleteiro, Maria & Ferreira, Fernando  
CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal

**ABSTRACT:**

**Introduction**  
The Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER-2) oncogene encodes for a 185kD transmembrane glycosylated protein that is overexpressed in 15-30% of human breast cancer. Because HER-2 has prognostic and predictive value, its tumour status is evaluated according to well-established guidelines. For the Canine Mammary Tumors (CMT) no concordant data is available, with studies demonstrating very different results (15-74% positive cases). This study aimed to optimize HER-2 detection and evaluation in CMT by immunohistochemical technique.

**Material & Methods**  
Twenty-one malignant tumours were subjected to ten different protocols which varied in the primary antibody used (SP3, Zytomed; 4B5, Ventana; TAB250, Zymed; CB11, Invitrogen) and in the antigen retrieval method (Tris-EDTA buffer, pH 9.0, in microwave; citrate buffer, pH 6, in a pressure chamber or in water bath and proteolytic digestion with Protease K). The HER-2 immunostaining was evaluated according to the American Society of Clinical Oncology guidelines.

**Results**  
All the antibodies tested showed species cross-reactivity (except clone TAB250) showing a prevalence of positive cases that ranged between different antibodies. The best results were obtained when CB11 antibody was associated with pressure chamber retrieval method. 42.9% of the CMT were classified as HER2-positive tumours (scored as 2+ or 3+).

**Conclusion**  
The present study showed a high variability among different antibodies, which supports the previously results published and enhances the need of establishment of guidelines for HER-2 evaluation in dog. Our results also showed that HER-2 is frequently overexpressed in CMT suggesting that dog can be a suitable cancer model.

**Acknowledgements**  
Maria Soares is supported by the FCT grant [SFRH/BD/70720/2010]. The authors would like to thank to Nuno Coelho and Tiago Silva for their technical assistance and to Dr. José Cabeçadas and Dr. João Matos from the Anatomical Pathology Service of Instituto Português de Oncologia (IPO).

**References:**  
1. Gama A, et al. (2008). *Veterinary Record*, 453, 123-132.  
2. Kim NH, et al. (2013). *Journal of Comparative Pathology*, 148(4), 298-305.  
3. Savarino R, et al. (2013). In: *Wetmore & Macdonald's Small Animal Clinical Oncology* (9th ed., 2013). 538-556.  
4. Minkley W (2002). In: *Tumors in Domestic Animals*, 575-606.  
5. Kim NH, et al. (2011). *The Veterinary Journal*, 186(3), 319-322.  
6. Martin de las Mulas J, et al. (2003). *Breast Cancer Research and Treatment* 80, 363-367.  
7. Press M, et al. (2002). *Journal of Clinical Oncology*, 20, 3096-3105.  
8. Singer J, et al. (2012). *Molecular Immunology* 50, 200-209.  
9. Wall AC, et al. (2007). *Arch Pathol Lab Med*, 131(1), 18-43.  
10. Goldschmidt M, et al. (2011). *Veterinary Pathology*, 48(1), 117-131.

**INTRODUCTION**

Mammary gland tumours are the most common neoplasm in sexually intact female dogs representing 50 to 70% of all tumours in this of population and approximately half of the neoplasms are considered malignant. Canine Mammary Tumors (CMT) consist in an extraordinarily heterogeneous group in terms of morphology and biological behavior that make it difficult to determine a prognosis<sup>1,2,3,4</sup>. For this reason several prognostic factors have been studied including the expression of the HER-2. This proto-oncogene belongs to the Human Epidermal Growth Factor Receptor family and encodes a 185kD transmembrane glycosylated protein, which contain three domains: (1) an extracellular ligand-binding domain, (2) a transmembrane domain, and (3) an intracellular domain with tyrosine kinase activity involved in signal transduction pathways that regulate cell growth and differentiation<sup>5,6</sup>. In Humans its amplification, identified in 15 % to 30% of breast cancers, is positively correlated with poor prognosis and, for this reason, evaluation guidelines are well-established as well as new treatment techniques like the combined immunotherapy<sup>7,8,9</sup>. For the CMT no concordant data is available, with results ranging from 15 to 74% HER-2 overexpression positivity, and the guidelines for its detection are yet to be established<sup>10</sup>. This study aimed to optimize HER-2 detection and evaluation in CMT by immunohistochemical technique.

**MATERIAL & METHODS**

**Sample collection and Histology**  
The 21 mammary glands tumours samples were obtained from the Veterinary Teaching Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Lisbon, Portugal. The samples were fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 to 48 hours and embedded in paraffin blocks according to American Society of Clinical Oncology (ASCO) guidelines<sup>9</sup>. For histology examination, sections of 4µm thick were stained with haematoxylin-eosin and tumours were classified according to the Histologic Classification proposed in 2010<sup>10</sup>.

**Immunohistochemistry**  
For the ten different protocols, sections were mounted on Starfrost® microscope slides and dried at 60°C for 60'. Each slide was deparaffinized and rehydrated in distilled water through a series of graded alcohols and then submitted to antigen retrieval (Table I). To exhaust endogenous peroxidase activity Peroxide-Block solution was used for 10'. All primary antibodies (SP3, Zytomed®; 4B5, Ventana®; TAB250, Zymed®; CB11, Invitrogen®) were applied for 60' at room temperature. The slides were then re-incubated with the secondary antibody for 30' and DAB was used as the chromogen prior to counterstain with Mayer's hematoxylin. The positive control was the SKBR3 cell line, with known overexpression of HER-2 (scored as 3+) and the negative control consisted in a human breast carcinoma negative for HER-2. The slides were submitted to blind scoring by two DVM pathologists. The HER-2 immunostaining was evaluated according to the ASCO guidelines (Table II). In this semi-quantitative assay the cases in which more than 30% of neoplastic cells had completed membranous staining were considered positive (scores 2+ and 3+) whereas no staining (score 0) or less than 30% of neoplastic cells had completed membranous staining (score 1+) was considered negative. Cytoplasmic staining was considered nonspecific staining.

**RESULTS**

The mean age of the 21 females dogs was 10.8 years and they were all not spayed by the time of the surgery. Simple cystic-papillary carcinoma was the most common type (33.3%), followed by simple tubulopapillary carcinoma (14.28%) and simple tubular carcinoma (14.28%) (Table III). In the HER-2 immunohistochemical assay (Figure 1), two out of the four antibodies, namely TAB 250 and SP3, showed no immunoreactivity. The best results were obtained with the CB11 antibody (Figure 2), with positivity in 9 cases (42.9%), when associated with the pressure chamber as antigen retrieval method. For the 4B5 antibody, the immunoreaction was distinctly lower, with six positive cases (28.57%) when submitted to antigen retrieval with the pressure chamber (Table IV).

**Table I: Primary antibodies and antigen retrievals.**

Primary Antibody			Antigen Retrieval
Clone	Dilution	Incubation Time	
CB11	RTU	60'	Water bath, 95°C, with citrate buffer (pH 6.0), 60';
4B5	RTU	60'	Pressure chamber (2 atm, 2'), with citrate buffer (pH 6.0);
SP3	1:100	60'	Microwave, 800W, 5' + 600W, 15', with Tris-EDTA buffer (pH 9.0);
TAB250	1:50	60'	Protease K, 10'

RTU, ready-to-use

**Table II: Interpretation Criteria**

Grade	Interpretation
0	No staining
1+	Weak, incomplete membranous staining in any proportion of tumor cells.
2+	Complete membrane staining that is either no uniform or weak in intensity but with obvious circumferential distribution in at least 30% of cells.
3+	Uniform intense membrane staining of at least 30% of invasive tumor cells.

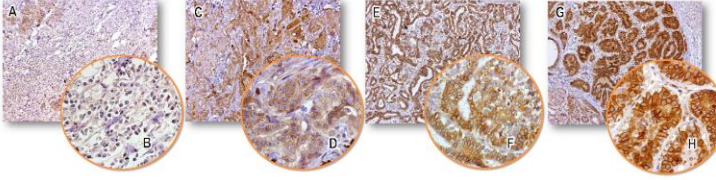
**Table III: Histologic classification and grading of the samples submitted to immunohistochemical evaluation.**

Histologic classification	Malignant Grade	Samples (%)	TOTAL
Simple Cystic-papillary Carcinoma	II	7/21 (33.33%)	33.33%
Simple Tubulopapillary Carcinoma	II	3/21 (14.29%)	14.29%
Simple Tubular Carcinoma	II	3/21 (14.29%)	14.29%
Complex Tubular Carcinoma	I	1/21 (4.76%)	4.76%
Complex Tubular Carcinoma	III	1/21 (4.76%)	4.76%
Simple Anaplastic Carcinoma	III	1/21 (4.76%)	4.76%
Squamous Cell Carcinoma	I	1/21 (4.76%)	4.76%
Mucinous Carcinoma	II	1/21 (4.76%)	4.76%
Adenosquamous Carcinoma	III	1/21 (4.76%)	4.76%
Complex Tubulopapillary Carcinoma	I	1/21 (4.76%)	4.76%
Complex Cystic Tubular Carcinoma	I	1/21 (4.76%)	4.76%
Total		21	100%

**Table IV: Results of immunohistochemistry (IHC) with primary monoclonal antibodies CB11 and 4B5.**

Primary Antibody	Retrieval antigen method	IHC			
		0	1+	2+	3+
CB11	Water bath, citrate buffer	47.6% (10/21)	14.3% (3/21)	33.3% (7/21)	4.8% (1/21)
	Pressure chamber, citrate buffer	28.6% (6/21)	28.6% (6/21)	33.3% (7/21)	9.5% (2/21)
	MW, EDTA buffer	9.5% (2/21)	52.4% (11/21)	33.3% (7/21)	4.8% (1/21)
	Water bath, citrate buffer	9.5% (2/21)	4.8% (1/21)	0	0
4B5	Water bath, citrate buffer	45% (9/20)	25% (5/20)	20% (4/20)	10% (2/20)
	Pressure chamber, citrate buffer	85% (17/20)	5% (1/20)	10% (2/20)	0
	MW, EDTA buffer	85% (17/20)	5% (1/20)	10% (2/20)	0
	MW, EDTA buffer	85% (17/20)	5% (1/20)	10% (2/20)	0

MW, microwave



**Figure 1:** Simple Tubulopapillary Carcinoma (A) and (B) HE staining (A: 100x and B: 400x). (C) and (D) Simple Tubular Carcinoma classified as 1+ with SP3 antibody and pressure chamber antigen retrieval (C: 100x and D: 400x). (E) and (F) Simple Tubular Carcinoma classified as 1+ with CB11 antibody and pressure chamber antigen retrieval (E: 100x and F: 400x).

**Figure 2:** HER-2 Immunohistochemical staining using CB11 antibody and pressure chamber antigen retrieval (A) and (B) No staining in an Adenosquamous Carcinoma (A: 100x and B: 400x). (C) and (D) Simple Tubular Carcinoma classified as 1+ (C: 100x and D: 400x). (E) and (F) Complex Tubulopapillary Carcinoma classified as 2+ (E: 100x and F: 400x). (G) and (H) Complex Tubular Carcinoma classified as 3+ (G: 100x and H: 400x).

**CONCLUSION**

This study showed a high variability among different antibodies, which supports the previously results published. Only the antibodies that recognize the intracellular domain have detected the HER-2 receptor. There is no correlation between the HER-2 overexpression and the malignancy grade or the histological type of the tumour. Our results also showed that HER-2 is frequently overexpressed in CMT suggesting that dog can be a suitable cancer model for human studies. Finally, overexpression of the HER-2 protein opens new perspectives for studies on combined immunotherapy for application in female dog.

**FCT**  
Fundação para a Ciência e a Tecnologia

**SVONC**  
congress

ESVONC Annual Congress 2013, Lisbon, Portugal  
30th - 31st May & 1st June 2013



- b. Comunicação oral no XVIII Encontro da Sociedade Portuguesa de Patologia Animal (9 e 10 de maio de 2013, Évora, Portugal)

# OTIMIZAÇÃO DA IMUNODETEÇÃO DO RECETOR HER2 EM TUMORES MAMÁRIOS DE CADELA

Beselga, A.<sup>1</sup>; Soares, M.J.<sup>1</sup>; Carvalho, S.<sup>1</sup>; Matos, J.<sup>2</sup>; Cabeçadas, J.<sup>2</sup>; Correia, J.<sup>1</sup>;  
Peleteiro, M.C.<sup>1</sup>; Ferreira, F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Univ. Técnica de Lisboa

<sup>2</sup>Serviço de Anatomia Patológica, Inst. Português Oncologia-EPE




*XVIII Meeting of the Portuguese Society of Animal Pathology  
International Meeting of Leporidae Pathology, 9 and 10 May 2013*







- c. Poster no XVIII Encontro da Sociedade Portuguesa de Patologia Animal (9 e 10 de maio de 2013, Évora, Portugal)



## Immortalization of primary canine cell lines from mammary tumours: a protocol optimization

**Luís R Raposo<sup>1,2</sup>, Susana Santos<sup>1,2,3,4&</sup>, Joaquim Henriques<sup>5</sup>, Pedro Faísca<sup>5</sup>, Margarida Alves<sup>5</sup>, André Beselga<sup>6</sup>, Jorge Correia<sup>6</sup>, Alexandra R Fernandes<sup>1,2,4,\*</sup>**

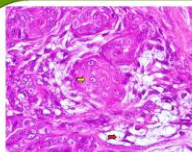
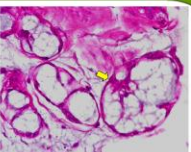
<sup>1</sup>Centro de Química Estrutural, Complexo I, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisbon, Portugal, <sup>2</sup>Escola de Engenharia, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisbon, Portugal, <sup>3</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Humana, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal, <sup>4</sup>Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal, <sup>5</sup>Centro de Investigação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisbon, Portugal, <sup>6</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisbon, Portugal. \*Corresponding author (alexandrfernandes@gmail.com)

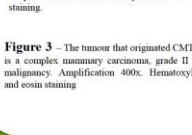
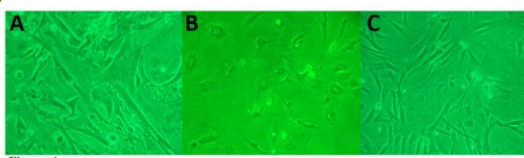
### Introduction

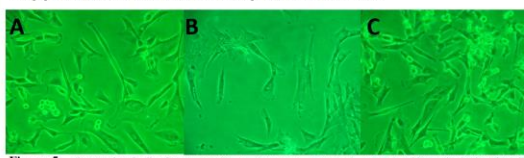
Canine mammary tumours (CMTs) are the most common neoplasms in intact female dogs (Sleeckx, de Rooster *et al.* 2011). European studies showed an incidence rate of approximately 200/100000 dogs/year (Merlo, Rossi *et al.* 2008; Vascellari, Baioni *et al.* 2009). CMTs classification is traditionally made on the basis of histological characteristics as depicted in the World Health Organization (WHO) criteria (Misdorp, Else *et al.* 1999; Goldschmidt, Pena *et al.* 2011). The tumours often have a complex morphology consisting of epithelial, myoepithelial, mesenchymal or mixed-type cells; about 50% being malignant (Sleeckx, de Rooster *et al.* 2011). For malignant CMT variants, surgery is the only successful treatment option since chemotherapy with agents such as doxorubicin and docetaxel has not radically increased overall survival time (Simon, Schoenrock *et al.* 2006). Although there are no established guidelines for treatment beyond surgery, dogs with locally advanced disease, with metastatic CMTs or with a biologically aggressive histological type of CMT may benefit from adjuvant treatment such as radiotherapy, anti-Cox-2 treatment, chemotherapy or anti-angiogenic therapy, being the majority of these treatments still in an experimental phase in veterinary medicine (Sleeckx, de Rooster *et al.* 2011). The understanding of the mechanisms underlying the inefficiency of chemotherapy via intrinsic or acquired drug resistance in dogs is also crucial. Therefore, it is a key issue to develop cellular models to validate new therapeutic compounds for CMT treatment. Immortalized CMT cell lines may be a valuable tool that will allow achieving a better knowledge on the cellular and molecular mechanisms underlying CMT tumorigenesis.

### Materials and Methods

For CMT cell line immortalization, we optimized a protocol first described by Chang (Chang, Chiou *et al.* 2010). The intra operative tumor samples obtained were washed three times in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) supplemented with 500 U/mL of penicillin and 500 µg/mL of streptomycin (Gibco). The samples are then minced and incubated in TrypLE Express (Gibco) for one hour at 37°C. In the original protocol, cells incubated in 0.25% trypsin and 0.2% EDTA were cooled on ice for one hour. Individual cells were then collected by centrifuging at 180 xg for 5 minutes. The cells were resuspended in DMEM supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum, FBS, (Gibco), 100 U/mL of penicillin and 100 µg/mL of streptomycin (Gibco) and seeded in 25 cm<sup>2</sup> flasks. The cells are grown at 37°C in a humidified atmosphere enriched with 5% CO<sub>2</sub>. The cells are allowed to grow until a confluent primary cell monolayer is formed. The cells are then trypsinized with TrypLE Express (Gibco) until cells detach from the flasks, centrifuged at 180 xg for 5 minutes and counted using Neubauer Chambers. Starting from this first trypsinization, in each passage 5x10<sup>6</sup> cells are seeded in 75cm<sup>2</sup> flasks.



### Results and Conclusions

The one hour trypsinization of the biopsies is crucial in order to obtain sufficient isolated cells capable of growing into confluent primary cell monolayers. Using cooling on ice during this incubation, as first described by Chang (Chang, Chiou *et al.* 2010), 18 monolayers were obtained from 32 samples. Using 37°C as the incubation temperature we obtained 33 monolayers from 33 samples. At this time, we have three cell lines that have been trypsinized more than 10 times and might originate immortalized primary CMT cell lines. CMT-1 is derived from a grade II mammary complex carcinoma (Figure 1) and has been trypsinized for 11 times. CMT-2 is derived from a grade II mammary simple carcinoma (mucinous type) (Figure 2) and has been trypsinized for 16 times. CMT-3 is derived from a grade II mammary complex carcinoma (Figure 3) and has been trypsinized for 14 times. It is possible to observe cells with different morphologies in the primary cell monolayers (figure 4). However with trypsinization, the morphology of the cells tend to become more homogenous (Figure 5). The cell morphology is compatible with an epithelial origin, however, the obtained primary cells lines need to be further characterized in order to evaluate typical alterations of CMT regarding (i) epithelial markers such as keratins (K14, K18) and cytokeratins (AE1, AE3), (ii) progesterone, estrogen and HER2 receptors and (iii) apoptosis associated genes (p53, Bax, Bcl-2).

### Bibliography

Chang, C. Y., P. P. Chiou, *et al.* (2010). "Assessment of the tumorigenicity and drug susceptibility of three new canine mammary tumor cell lines." *Research in Veterinary Science* 90(2): 285-293.

Goldschmidt, M., L. Piva, *et al.* (2011). "Classification and grading of canine mammary tumors." *Veterinary Pathology* 48(1): 117-131.

Mishra, D. P., J. E. Ross, *et al.* (2008). "Cancer incidence in pet dogs: findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22(4): 976-984.

Misdorp, W., R. W. Ellis, *et al.* (1999). *WHO International Classification of Mammary Tumors of the Dog and Cat*. Washington, DC: The Armed Forces Institute of Pathology: American Registry of Pathology.

Simon, D., D. Schoenrock, *et al.* (2006). "Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30(7): 1188-1190.

Sleeckx, N., H. de Rooster, *et al.* (2011). "Canine mammary tumours, an overview." *Reproduction in Domestic Animals* 46(5): 1112-1131.


Vascellari, M., E. Baioni, *et al.* (2009). "Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats." *BMC Veterinary Research* 5: 30.

### Acknowledgments


This work was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) grant SFRH/BD/70202/2010 to LRR.




- d. Poster no Congresso Anual da ESVONC 2013 (30-31 de maio & 1 de junho de 2013, Lisboa, Portugal)




FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA




TÉCNICO  
LISBOA




CQE  
QUÍMICA ESTRUTURAL



FACULDADE DE  
FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



UNIVERSIDADE LUSÓFONA  
Faculdade de Medicina Veterinária



centro de investigação de  
biologia biotecnológica e  
biomedicina  
UNIVERSIDADE LUSÓFONA

## Insights into the molecular basis of canine mammary cancer: the use of miRs in the characterization of canine mammary tumours

Luís R Raposo<sup>1,2,3,4</sup>, Susana Santos<sup>1,2,3,4</sup>, Joaquim Henriques<sup>5</sup>, Pedro Faísca<sup>5</sup>, Margarida Alves<sup>5</sup>, André Beselga<sup>6</sup>, Jorge Correia<sup>6</sup>, Alexandra R Fernandes<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Química Estrutural, Complexo I, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisbon, Portugal, <sup>2</sup>Escola de Engenharia, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisbon, Portugal, <sup>3</sup>Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Caparica, Portugal, <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica e Biologia Humana, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal, <sup>5</sup>Centro de Investigação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisbon, Portugal, <sup>6</sup>Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal - CISA Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisbon, Portugal. \*Corresponding author (alexandrarcfernandes@gmail.com)

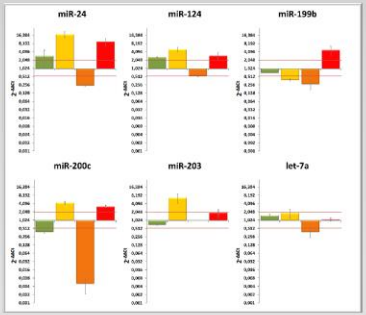
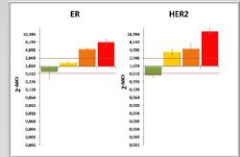
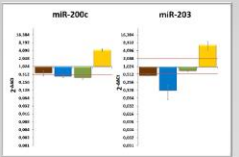
### Introduction

Canine mammary tumours, CMTs, are the most common type of tumours found in female dogs (Sleeckx, de Rooster *et al.* 2011). The differential expression of microRNAs (miRs) has been associated with tumour suppressive and oncogenic patterns in what concerns CMT phenotype (Boggs, Wright *et al.* 2008). However, the clinical value of these miRs, for instance as cancer biomarkers in dog, has not been completely proved. The expression changes in six miRs (miR-24-3p, miR-124-3p, miR-199b-5p, miR-200c-3p, miR-203 and let-7a) and the mRNA expression level of genes encoding the oestrogen receptor (ER) and of the canine homolog of the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) were quantified by Real-Time PCR, qRT-PCR, in four Grade III CMTs, a Grade I simple tubular CMT and a Grade II complex tubular-papillary CMT. The Grade III tumours analysed were a simple tubular CMT without metastasis, a simple tubular CMT with metastasis in the lymph nodes, a simple anaplastic CMT without metastasis and a adenosquamous CMT with metastasis in the lymph nodes.

### Materials and Methods

Total RNA from 5 biopsies of paired normal and tumour tissue samples preserved in RNAlater (Ambion) was extracted using the kit SV total RNA Isolation System (Promega). RNA integrity was evaluated through RIN parameter by using the Bioanalyzer platform. High quality total RNA (RIN values between 7.6-9.4) was used for cDNA synthesis with the Universal cDNA Synthesis Kit of the miRCURY LNA™ Universal RT-microRNA PCR system (Exiqon). Real Time PCR (RT-PCR) for miR-24-3p, miR-124-3p, miR-199b-5p, miR-200c-3p, miR-203, let-7a and U6 SnRNA (housekeeping RNA) was performed through SYBR® Green master mix Universal RT-PCR (Exiqon) using LNA™ PCR Primer Sets (Exiqon) in a LightCycler 480 (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Regarding the ER and HER2 mRNA quantification, cDNA was synthesized using the cDNA Synthesis Kit (Bioline). Real Time PCR for ER and HER2 mRNA quantification was executed using the SensiFAST SYBR No-ROX Kit (Bioline) and the following primers (i) ER-fw 5'-CCTTCAGTGAAGCTTCGATG-3' and ER-rv 5'-AGAAGTGGACCTGATGATG-3' and (ii) HER2-fw 5'-CAGCCTGGTCACTACAA-3' and HER2-rv 5'-CAGCCTGGTCACTACAA-3'. The gene rRNA18S was used as endogenous control and was detected using the primers 18S-fw 5'-GTAACCGTGAACCCCAAT-3' and 18S-rv 5'-CCATCACTGGTAGTAGG-3'. Data analysis regarding relative gene expression for RT-PCR was performed using the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method (Livak and Schmittgen, 2001). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v5.00. miRs and mRNA gene expression values were considered with a significant differential expression relative to normal tissue from values 12-fold higher (2<sup>ΔΔCt</sup>>2) or 2-fold lower (2<sup>-ΔΔCt</sup><0.5).

### Results

**Figure 1:** Relative gene expression of miRs displayed as 2<sup>ΔΔCt</sup> fold changes for the Grade III tumours analysed. Significant gene expression changes were assumed when the expression level of miRs were at least 2-fold higher in tumoral tissue than in normal tissue (2<sup>ΔΔCt</sup>>2) or when the expression level of miRs were at least 2-fold lower in the tumoral tissue than in normal tissue (2<sup>-ΔΔCt</sup><0.5), as shown by the horizontal lines (dark red) in the figure.

**Figure 2:** Relative gene expression of mRNAs displayed as 2<sup>ΔΔCt</sup> fold changes for the Grade I, Grade II and Grade III tubular tumours analysed. Significant gene expression changes were assumed when the amounts of mRNAs were at least 2-fold higher in tumoral tissue than in normal tissue (2<sup>ΔΔCt</sup>>2) or when the amount of mRNAs were at least 2-fold lower in the tumoral tissue than in normal tissue (2<sup>-ΔΔCt</sup><0.5), as shown by the horizontal lines (dark red) in the figure.

**Figure 3:** Relative gene expression of miRs displayed as 2<sup>ΔΔCt</sup> fold changes for the Grade I, Grade II and Grade III tubular tumours analysed. Significant gene expression changes were assumed when the amounts of miRs were at least 2-fold higher in tumoral tissue than in normal tissue (2<sup>ΔΔCt</sup>>2) or when the amount of miRs were at least 2-fold lower in the tumoral tissue than in normal tissue (2<sup>-ΔΔCt</sup><0.5), as shown by the horizontal lines (dark red) in the figure.

Compared with the other Grade III tumours, the adenosquamous CMT with metastasis displayed a specific miR expression pattern, as observed by the down-regulation of the expression of almost all miRs (miR-24, miR-199b, miR-200c and let-7a) (Figure 1). On the other hand, the Grade III anaplastic CMT displayed a significant increase in the expression levels of miR-24, miR-124, miR-199b, miR-200c and miR-203 (Figure 1). Indeed, an up-regulation of miR-199b was observed only in this type of CMT (Figure 1).

Regarding ER and HER2 mRNA expression levels, an up-regulation were also observed particularly for the adenosquamous CMT with metastasis and anaplastic CMT (Figure 2).

When comparing miR-200c and miR-203 expression levels between the three different tubular CMT grades (Figure 3) we can observe an up-regulation of both miRs for the Grade III tumour compared with lower Grade tubular tumours. It should be interesting to include more samples in order to validate the potential of this two miRs as biomarkers for Grade III tubular CMTs with metastasis.

### Conclusions

Despite the low number of samples analysed so far, it is possible to establish some working hypothesis. It is possible to hypothesize 2 expression signatures for metastatic Grade III adenosquamous CMT and for Grade III anaplastic CMT without metastasis.

The up-regulation of miR-200c and miR-203 may be indicative of an advanced metastatic Grade III tubular CMT. Induced up-regulation of miR-200 in a mouse mammary cancer line 4T07 have been shown to induce metastasis in a otherwise non-metastatic cell line (Dykhoorn 2010) and miR-203 is known repressor of p63, a member of the p53 family of transcription factors (figure 4).

An up-regulation of miR-24 and miR-124 was observed in Grade III CMTs with the exception of metastatic Grade III adenosquamous CMT. These miRs are involved in the down-regulation of proteins such as p16, with a role in cell cycle arrest (Santarpia, Nicoloso *et al.* 2010; May, Sphyris *et al.* 2011).

The higher expression levels of ER and HER2 mRNA in Grade III tumours are consistent with previous published observations (Rivera and von Euler 2011).

### References

Boggs, R. M., Z. M. Wright, *et al.* (2008). "MicroRNA expression in canine mammary cancers." *Mammalian Genome* 19(7-8): 561-569.

Dykhoorn, D. M. (2010). "MicroRNAs and metastasis: little RNAs go a long way." *Cancer Research* 70(16): 6401-6406.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method." *Methods* 25(4): 402-408.

May, C. D., N. Sphyris, *et al.* (2011). "Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression." *Breast Cancer Research* 13(1): 202.

Rivera, P. and H. von Euler (2011). "Molecular biological aspects on canine and human mammary tumors." *Veterinary Pathology* 48(1): 132-146.

Santarpia, L. M., Nicoloso, *et al.* (2010). "MicroRNAs: a complex regulatory network drives the acquisition of malignant cell phenotype." *Endocrine-Related Cancer* 17(1): F51-75.

Sleeckx, N., H. de Rooster, *et al.* (2011). "Canine mammary tumours, an overview." *Reproduction in Domestic Animals* 46(6): 1112-1131.

### Acknowledgments

This work was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (PID grant SFRH / BD / 70202 / 2010 to LRR)

